



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/88, A61K 48/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/22610 (43) Date de publication internationale: 28 mai 1998 (28.05.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/02022 (22) Date de dépôt international: 10 novembre 1997 (10.11.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/13990 15 novembre 1996 (15.11.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): I.D.M. IMMUNO-DESIGNED MOLECULES [FR/FR]; 172, rue de Charonne, F-75011 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MIDOUX, Patrick [FR/FR]; 21, rue du Poinçon, F-45100 Orléans (FR). MONSIGNY, Michel [FR/FR]; 341, rue des Bouvreuils, F-45590 Saint-Cyr-en-Val (FR). (74) Mandataires: GROSSET-FOURNIER, Chantal etc.; Grosset-Fournier & Demachy S.A.R.L., 103, rue La Fayette, F-75481 Paris Cedex 10 (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: NOVEL POLYMERIC COMPLEXES FOR THE TRANSFECTION OF NUCLEIC ACIDS, WITH RESIDUES CAUSING THE DESTABILISATION OF CELL MEMBRANES		
(54) Titre: NOUVEAUX COMPLEXES POLYMERIQUES POUR LA TRANSFECTION D'ACIDES NUCLEIQUES, AVEC DES RESIDUS DESTABILISANT DES MEMBRANES CELLULAIRES		
(57) Abstract <p>The invention concerns a complex between at least a (negatively charged) nucleic acid and at least a positively charged polymeric conjugate, the bond between the nucleic acid and the polymeric conjugate being electrostatic in nature, the polymeric conjugate containing a polymer formed by monomer units bearing free NH₃⁺ functions, and being such that: the free NH₃⁺ functions of said monomer units are substituted in a ratio of at least 10 % by residues causing in weak acid medium destabilisation of cell membranes, in particular the endocytosis vesicle membrane, and/or endosomes; said residues having further the following properties: they comprise a functional group for being fixed to said polymer, they are not active as recognition signal identified by a cell membrane receptor, they can comprise at least one free NH₃⁺ function; said uncharged residues having further the following properties: they comprise at least a hydroxyl group, they are not active as recognition signal identified by a cell membrane receptor, the hydroxyl groups of said uncharged residues being capable of being substituted by at least a molecule which constitutes a recognition signal identified by a cell membrane receptor, with reservation that the whole set of free NH₃⁺ functions is at least 30 % of the number of monomer units of the polymeric network of said polymeric conjugate.</p>		
(57) Abrégé <p>L'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH₃⁺ libres, et étant tel que: les fonctions NH₃⁺ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10 %, par des résidus entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose, et/ou des endosomes; les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes: ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère; ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire; ils peuvent comporter au moins une fonction NH₃⁺ libre; les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes: ils comportent au moins un group hydroxyle; ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire; les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés pouvant être substitués par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que l'ensemble des fonctions NH₃⁺ libres soit d'au moins 30 % du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

NOUVEAUX COMPLEXES POLYMERIQUES POUR LA TRANSFECTION D'ACIDES NUCLEIQUES, AVEC DES RESIDUS DESTABILISANT DES MEMBRANES CELLULAIRES

5 L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acides nucléiques et de polymère substitué par des résidus entraînant la déstabilisation des membranes cellulaires.

L'introduction d'un gène étranger dans une cellule est la base de la
thérapie génique. Le transfert de gènes peut être obtenu en utilisant soit un
10 matériel viral modifié (virus de la vaccine, rétrovirus, adénovirus ou virus de l'herpès), soit en utilisant des vecteurs non viraux (lipides cationiques, liposomes). Les premiers bien qu'efficaces, présentent des problèmes de sécurité. Pour les derniers, l'efficacité est fortement diminuée en présence de sérum et de ce fait leur utilisation est restreinte à l'*in vitro* ou à l'*ex vivo*.

15 La polylysine qui peut former des complexes électrostatiques stables avec un ADN plasmidique est à la base du développement de vecteurs non viraux pour transférer des gènes dans des cellules animales.

Les complexes d'ADN et de polylysine non substituée ne sont
généralement pas efficaces pour transfecter des cellules du fait de la très grande
20 stabilité des complexes (donc dissociation et relargage de l'ADN faibles) dans les conditions physiologiques par suite d'une très grande coopérativité des interactions polycation-polyanion.

L'efficacité de transfection peut être améliorée lorsque le nombre de
charges présent sur le polypeptide est diminué afin de réduire les forces
25 d'interactions entre l'ADN et la polylysine. Par exemple, lorsque 40% des fonctions $\epsilon\text{-NH}_3^+$ des résidus lysine de la polylysine sont partiellement neutralisées par des dérivés polyhydroxyalcanoyles tels que la δ -gluconolactone, les complexes ADN/polylysine partiellement gluconoylée sont plus efficaces que les complexes ADN/polylysine pour transfecter les cellules.

30 La polylysine peut être substituée par des ligands spécifiques de récepteurs présents à la surface des cellules et capables d'induire une endocytose spécifique des complexes avec un ADN plasmidique par des cellules cibles.

Des conjugués obtenus en substituant de la polylysine par
l'asialoorosomucoïde, la transferrine, l'insuline, des immunoglobulines et des
35 facteurs de croissance ont été proposés comme vecteurs guides de plasmides. Cependant, ces ligands protéiques rendent les complexes très immunogéniques.

La polylysine peut être substituée par des ligands de petite masse
moléculaire moins immunogènes tels que des osides et oligosides reconnus par

des récepteurs membranaires spécifiques (lectines membranaires) à la surface des cellules cibles. La polylysine glycosylée a été proposée comme vecteurs non viraux parfaitement définis pour transférer des gènes.

De nombreuses cellules animales possèdent des lectines membranaires qui reconnaissent des oligosides de structures variées et qui induisent l'endocytose de leurs ligands. Par exemple, la lectine membranaire des cellules du parenchyme hépatique reconnaît des structures glucidiques comportant un résidu galactose en position terminale, ce qui est le cas des glycoprotéines sériques désialylées. La spécificité des lectines membranaires dépend du type cellulaire et de l'état de différenciation des cellules.

L'efficacité de la transfection des complexes ADN/polylysine glycosylée dépend du taux de substitution de la polylysine par des osides : les transfections les plus efficaces sont obtenues lorsque 30 à 40% des fonctions $\epsilon\text{-NH}_3^+$ des résidus lysine de la polylysine sont substituées par des mono- ou des dissacharides.

Dans le brevet français n° 2,719,316, il a été montré que l'utilisation de la polylysine partiellement gluconoylée comportant un nombre des charges positives déjà réduit permet d'abaisser d'un facteur 5 à 10 le nombre d'osides qu'il est nécessaire de fixer sur le polymère pour obtenir une bonne efficacité de transfection des complexes ADN/polylysine glycosylée et gluconoylée. L'utilisation de la polylysine partiellement gluconoylée permet d'augmenter la solubilité des complexes et de réduire leur taille aux environs de 50 nm.

Le transport des plasmides par des vecteurs non viraux susceptibles d'être reconnus spécifiquement par des composés de la membrane plasmique des cellules relève d'une démarche imitant le mécanisme d'entrée du matériel génétique viral dans une cellule. Dans tous les cas décrits, les complexes ADN/polymère polycationique sont entraînés dans des vésicules d'endocytose, dans des endosomes et probablement dans d'autres compartiments intracellulaires plus profonds, éloignés de la membrane plasmique.

Le passage transmembranaire de l'ADN plasmidique est de ce fait une étape critique vis à vis de la libération dudit ADN dans le cytosol pour son passage dans le noyau, où le gène sera exprimé.

Dans tous les cas décrits, des auxiliaires de passage transmembranaire sont utilisés pour favoriser le passage de l'ADN dans le cytosol. Il s'agit :

- de la chloroquine
- d'adénovirus défectifs
- des peptides perméabilisants et/ou fusiogènes

a) La chloroquine est une base faible utilisée à 50 μM ou 100 μM en culture *in vitro*, pour certaines cellules ces concentrations sont toxiques. La chloroquine, qui est perméante traverse la membrane et s'accumule dans les compartiments acides, parce qu'elle comporte des amines de faible pK qui captent des protons ; la chloroquine protonée est cationique et moins perméante. L'acidification des endosomes et des lysosomes est due à une enzyme membranaire qui injecte des H^+ à partir du cytosol, dans les vésicules ; pour rétablir l'électroneutralité cette accumulation de proton s'accompagne d'une entrée d'ions chlorure Cl^- . Au fur et à mesure que la chloroquine s'accumule, les protons et les chlorures s'accumulent également, ce qui provoque une augmentation de la force ionique intravésiculaire qui induit l'arrivée d'eau, d'où le gonflement des vésicules et leur déstabilisation. La concentration intracellulaire de la chloroquine peut être plus de 100 fois supérieure à sa concentration dans le milieu, après quelques heures. Elle peut donc dépasser 10 mM. Ce phénomène est comparable à ce qui se passe chez les personnes qui utilisent une dose quotidienne de 300 mg de chloroquine par jour. Après quelques jours, la concentration plasmatique est aux environs de 0,7 μM , la concentration tissulaire est 200 à 700 fois plus élevée, soit 140 à 500 μM . Et à l'intérieur des cellules, les compartiments acides peuvent atteindre des concentrations plusieurs dizaines de fois plus fortes. On sait par ailleurs que des concentrations 10 mM de chloroquine (concentration obtenue après quelques heures en ayant utilisé une concentration initiale de chloroquine de 100 μM) favorise la dissociation des complexes ADN/polylysine.

La chloroquine en association avec les complexes ADN/polylysine dans le transfert de gène n'est utilisable que dans des applications *in vitro* ou *ex vivo* du fait de sa toxicité et de sa rapide dilution après injection chez l'individu. En effet, *in vivo*, pour atteindre les concentrations élevées citées ci-dessus, il faut plusieurs jours. Or il a été montré *in vitro* que dans les cellules prétraitées à la chloroquine, l'expression des gènes transférés était très faible. En outre, si la chloroquine est ajoutée plus de trois heures après l'incubation des cellules en présence des complexes, la transfection est très faible. C'est pour ces raisons que la chloroquine, qui est un très bon auxiliaire *in vitro*, n'est pas efficace *in vivo*.

b) Les propriétés fusiogènes en milieu acide des particules d'adénovirus défectifs sont utilisées pour favoriser le passage de l'ADN dans le cytosol à partir des vésicules d'endocytose. Les adénovirus possèdent des protéines de fusion actives en milieu légèrement acide. Les adénovirus défectifs peuvent être utilisés libres ou fixés aux complexes ADN/polylysine.

L'utilisation de particules virales même défectives pose cependant des problèmes de sécurité. Les adénovirus induisent une très forte réponse immune après injection avec les complexes.

5 c) Des peptides perméabilisants et/ou fusiogènes en milieu légèrement acide sont utilisés comme auxiliaires pour favoriser le passage de l'ADN dans le cytosol. Il s'agit principalement de peptides de 20 acides aminés dérivant des protéines de fusion de virus comme par exemple le peptide N-terminal de la sous
10 unité HA2 de l'hémagglutinine du virus de la grippe, ou de peptides synthétiques tels que le GALA, un oligomère contenant plusieurs unités de répétition Glu-Ala-Leu-Ala. Ces peptides sont utilisés le plus souvent à l'état libre (c'est-à-dire non fixés covalamment) avec les complexes ADN/polylysine. L'efficacité des peptides est fortement diminuée en présence de sérum dans les milieu de culture cellulaire ce qui restreint leur utilisation aux expériences *in vitro* ou au *ex vivo*. Certains peptides fixés covalamment aux complexes
15 ADN/polylysine sont encore efficaces pour favoriser le passage transmembranaire de l'ADN, d'autres perdent leur pouvoir perméabilisant après fixation.

On sait, par ailleurs, qu'il existe d'autres molécules capables de déstabiliser des membranes et en particulier des molécules contenant le noyau
20 imidazole de l'histidine ($pK = 6,04$) qui en se protonant en milieu légèrement acide devient cationique. La polyhistidine possède des propriétés fusiogènes et perméabilisantes vis-à-vis des bicouches lipidiques. A $pH < 6$, la polyhistidine adopte une structure en hélice α (Norland K.S. *et al.* (1963) Biopolymers 1:277-278 ; Beychok S. *et al.* (1965) J. Amer. Chem. Soc. 87:3990-3991). Il a été
25 montré que la polyhistidine en milieu légèrement acide est un polycation qui agrège des liposomes chargés négativement et induit leur fusion (Wang C.-Y. et Huang L. (1984) Polyhistidine mediates an acid-dependent fusion of negatively charged liposomes. Biochemistry 23:4409-4416 ; Uster P.S. et Deamer D.W. (1985) pH-dependent fusion of liposomes using titrable polycations. Biochemistry 24:8-14).

30 On sait qu'un polymère synthétique (la cétylacétyl(imidazol-4-ylméthyl)polyéthyleimine) à pH légèrement acide induit la fusion de liposomes (Oku N. *et al.* (1987) Low pH induced membrane fusion of lipid vesicles containing proton-sensitive polymer. Biochemistry 26:8145-8150).

35 On sait également qu'un polymère neutre hydrosoluble substitué par des résidus histidyle (utilisé à la place de la polyhistidine très peu soluble en milieu aqueux) interagit uniquement en milieu légèrement acide avec un polyanion tel que l'acide polyaspartique et est capable de perméabiliser la membrane

plasmique des cellules dans un test de cytométrie en flux en utilisant le bromure d'éthidium comme marqueur (Midoux *et al.*, 1995).

Des résultats préliminaires ont montré que la polyhistidine (très peu soluble en milieu aqueux à pH neutre) ne peut être utilisée pour transférer des cellules car n'étant pas un polycation à pH neutre, elle n'est pas capable de former avec de l'ADN des complexes stables ayant une solubilité suffisante pour pouvoir être utilisé à pH neutre, en particulier à pH 7,4, le pH du plasma.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué susceptibles de transférer plusieurs types cellulaires.

L'invention a pour objet un nouveau type de polymère cationique comprenant, outre les charges positives du polymère, des substituants favorisant le passage transmembranaire de l'acide nucléique transporté et, le cas échéant, des substituants agissant en tant que signaux de reconnaissance. Les substituants favorisant le passage transmembranaire sont liés au polymère et sont des dérivés qui ne sont pas cationiques en milieu légèrement alcalin, mais le deviennent en milieu neutre et en milieu acide.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué susceptibles de favoriser le passage transmembranaire de l'ADN après endocytose des complexes.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué ne présentant pas de signaux de reconnaissance reconnus par des récepteurs membranaires à la surface des cellules.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué présentant en outre des signaux de reconnaissance reconnus par des récepteurs membranaires à la surface des cellules, conférant un caractère sélectif de la transfection vis-à-vis de différents types cellulaires.

L'invention a pour objet un procédé de transfection spécifique *in vitro* et *in vivo*.

L'invention a pour objet de nouveaux conjugués de polylysine substituée ne présentant pas de signaux de reconnaissance reconnus par des récepteurs membranaires à la surface des cellules, susceptibles d'être complexés à un acide nucléique en vue de la transfection d'une cellule.

L'invention a également pour objet de nouveaux conjugués de polylysine présentant en outre des signaux de reconnaissance reconnus par des récepteurs membranaires à la surface des cellules, susceptibles d'être complexés à un acide nucléique en vue de la transfection sélective d'une cellule.

L'intérêt de l'invention est que ces nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère sont susceptibles de transférer les cellules en l'absence

d'auxiliaires de passage transmembranaire (chloroquine ou peptides perméabilisants et/ou fusiogènes). Ce sont ici les groupements faiblement basiques, protonables (cation) en milieu légèrement acide, fixés sur le polymère qui jouent le rôle d'auxiliaires de passage transmembranaire.

5 L'intérêt de l'invention est que ces nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué sont aussi ou plus efficaces sans auxiliaires de passage transmembranaire que les complexes d'acide nucléique et de polymère non substitué ou substitué par des agents réduisant le nombre de charges du polymère (donc son interaction avec l'acide nucléique) en présence d'auxiliaires

10 de passage transmembranaire.

Dans le cas de la chloroquine et des peptides perméabilisants et/ou fusiogènes, ces derniers sont de petites molécules qui diffusent rapidement s'ils ne sont pas liés covalamment aux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué.

15 L'intérêt de l'invention est que ces nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué sont aussi efficaces (voire plus efficaces) en présence de sérum qu'en absence de sérum pour transfecter les cellules

Dans une de ses définitions les plus générales, l'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins

20 un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées

25 dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose, et/ou des

30 endosomes,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

. ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu

35 par un récepteur membranaire cellulaire,

. ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des

charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique au cours de la dissociation du complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes:

- . ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

- . soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),
- . soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl), notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus,
- . soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),
- . soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

Par déstabilisation des membranes, on entend une modification de la membrane qui conduit soit à l'augmentation de sa perméabilité vis-à-vis de molécules de soluté de faible masse moléculaire et éventuellement de haute masse moléculaire (y compris des acides nucléiques, des plasmides ou des complexes), soit à la fusion avec une autre membrane.

La perméabilité membranaire peut être mesurée par microscopie de fluorescence de la façon suivante :

Les cellules adhérentes sont incubées à 37°C pendant 15 à 30 minutes avec 0.5 ml de milieu de culture DMEM avec sérum contenant 5 mg/ml de dextran (Mw 4000) marqué avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FTC-Dextran) et un complexe ADN/polylysine histidylée. Les cellules sont ensuite lavées et incubées à 37°C pendant 15 à 30 minutes avec du milieu de culture contenant 10% de sérum bovin foetal. Les cellules sont ensuite fixées pendant 5 minutes dans une solution de tampon phosphate salin contenant 4% de p-formaldéhyde et la fluorescence est analysée avec un microscope de

fluorescence à plan confocal (MRC600 BioRad). En absence de perméabilisation membranaire, la fluorescence provenant du FTC-Dextran est localisée exclusivement dans des vésicules. En présence d'un agent de perméabilisation membranaire, la fluorescence provenant du FTC-Dextran est en outre observée de manière diffuse dans le cytosol et le noyau des cellules.

La fusion des membranes en présence de complexes ADN/polylysine histidylée se mesure facilement dans des systèmes modèles tels que les liposomes en utilisant une méthode de mélange lipidique comme celle décrite dans Struck D.K. *et al.* (Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. (1981) *Biochemistry* 20:4093-4099). Brièvement, on utilise des liposomes constitués de dioléoyl-phosphatidylcholine (DPOC) où sont insérés dans leur membrane du N-(7-nitrobez-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)phosphatidyl éthanolamine (NBD-PE) et de l'octadecylrhodamine (R18) comme marqueur fluorescent et des liposomes sans marqueurs fluorescents. On mesure la fluorescence du NBD ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$) en absence et en présence de complexes ADN/polylysine histidylée à différents pH. La fusion des liposomes induit une diminution de la fluorescence du NBD par suite d'une diminution du transfert d'énergie entre la rhodamine et le NBD.

Ces nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué contenant des groupements faiblement basiques, protonables (cation) en milieu légèrement acide en présence de sérum, sont donc mieux adaptés pour un transfert de gènes *in vivo* que les complexes ADN/polylysine ou ADN/polylysine gluconoylée qui ne sont actifs qu'en présence d'auxiliaires tels que la chloroquine ou des peptides fusiogènes et/ou perméabilisants.

Les résidus entraînent la déstabilisation des membranes cellulaires grâce à leur propriété d'être protonables en milieu acide.

Les résidus entraînant la déstabilisation des membranes cellulaires sont des capteurs de protons qui limitent l'acidification des endosomes et, en conséquence, défavorisent la fusion entre les endosomes tardifs et les liposomes. On rappelle que les lysosomes sont des vésicules contenant un grand nombre d'hydrolases et que ces lysosomes sont très efficaces pour dégrader les macromolécules biologiques en général et les acides nucléiques en particulier.

L'expression "milieu faiblement acide" désigne un milieu dont le pH est inférieur à celui du plasma ou du sérum, par exemple un pH inférieur à 7,4.

L'expression selon laquelle les résidus "ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire" signifie que, d'une part, à ce jour, il n'y a pas de récepteurs connus qui soient

spécifiques de ces résidus et, d'autre part, que ces résidus ne sont pas utilisés en tant que ligands.

Une molécule ou un complexe moléculaire est actif en tant que signal de reconnaissance, s'il peut être reconnu sélectivement par un récepteur, c'est-à-dire qu'il joue le rôle d'un ligand, d'un agoniste ou d'un antagoniste.

Par signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, on désigne généralement un ligand (molécule ou complexe moléculaire) capable d'être reconnu sélectivement par ledit récepteur (affinité ligand-récepteur $\geq 10^3$ l/mole).

L'invention concerne notamment un complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose et/ou des endosomes,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ce sont des bases dont le pK en milieu aqueux est inférieur à 8, de sorte qu'une proportion supérieure à 50% de ces bases liée à un polymère cationique ne soit pas protonée en milieu neutre de pH 4,
- . ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par au cours de la dissociation du complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes:

- . ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

. soit par substitution de certaines fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),

. soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl), et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge,

. soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),

. soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

L'invention concerne également un complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

. ils appartiennent à la famille des composés comportant un noyau imidazole,

. ils appartiennent à la famille des quinolines,

. ils appartiennent à la famille des ptérines,

. ils appartiennent à la famille des pyridines,

. les susdits résidus comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

. ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, et/ou par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique au cours de la dissociation du complexe, sous réserve que l'ensemble des susdits résidus contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par au moins une molécule constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, et/ou par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes:

. ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

. soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),

. soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl) et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge,

. soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),

. soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

Les signaux de reconnaissance peuvent également entraîner une diminution des charges positives du conjugué polymérique lorsqu'ils sont eux-mêmes

neutres ou acides et qu'ils sont liés au polymère par substitution d'une fonction NH_3^+ entraînant la perte de la charge +.

Les signaux de reconnaissance sont des molécules de petite masse moléculaire (< 5000 daltons).

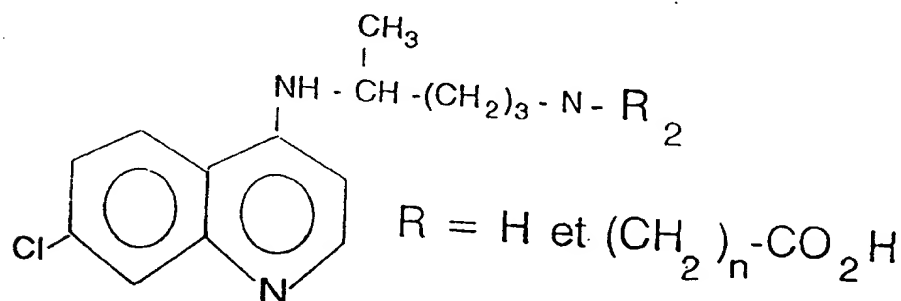
Le nombre de molécules de signal de reconnaissance fixé sur le polymère modifié peut être :

- pour une molécule signal de très haute affinité vis-à-vis de son récepteur ($K_a > 10^7$ l/mole), d'environ 0, 5 à 5, avantageusement 1 molécule pour environ 10 000 motifs monomères de polymère substitué soit 1 molécule pour environ 50 molécules de polymère substitué;

- pour une molécule signal de haute affinité vis-à-vis de son récepteur (K_a entre 10^5 l/mole et 10^7 l/mole), d'environ 0, 5 à environ 10, avantageusement 1 molécule pour environ 200 motifs monomères de polymère substitué soit 1 molécule pour environ 1 molécule de polymère substitué;

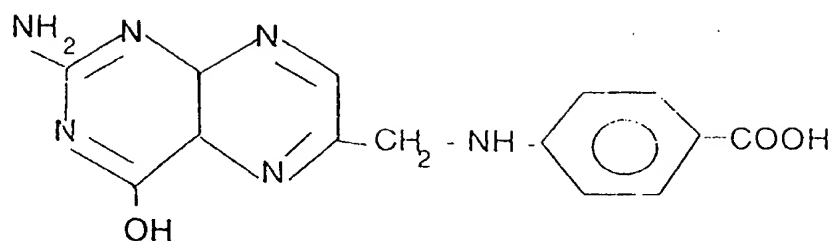
- pour une molécule signal de moyenne affinité vis-à-vis de son récepteur ($K_a < 10^5$ l/mole), d'environ 10 à environ 100, avantageusement 50 molécules pour environ 200 motifs monomères de polymère substitué soit 50 molécules pour environ 1 molécule de polymère substitué.

La famille des quinolines est représentée par la formule suivante :



dans laquelle n vaut de 1 à 10, de préférence de 1 à 3.

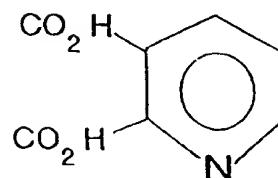
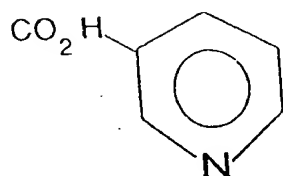
La famille des ptérines est représentée par la formule suivante :



10

La famille des pyridines est représentée par les formules suivantes :

15



20

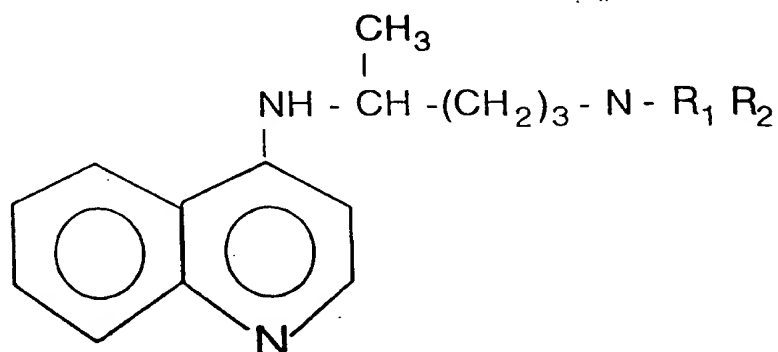
25

L'invention concerne également un complexe dans lequel les résidus entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires sont

- des alkyimidazoles dans lequel le radical alkyle comporte de 1 à 10, notamment de 2 à 6 atomes de carbone, et dans lequel un seul des atomes d'azote du noyau imidazole est substitué,

30

- ou des quinolines de formule :



dans laquelle R_1 représente H et R_2 représente $(CH_2)_n-CO_2-H$, n étant un nombre entier variant de 1 à 10, et de préférence valant de 1 à 3.

L'invention concerne également un complexe dans lequel les résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires sont choisis parmi : histidine, 4-carboxyméthyl-imidazole, 3-(1-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 3-(3-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 2-carboxy-imidazole, histamine, acide 3-(imidazol-4yl)-L-lactique, 2-(1-méthyl-imidazol-4yl)éthylamine, 2-(3-méthyl-imidazol-4yl)éthylamine, β -alanyl-histidine-(carnosine), 7-chloro-4(amino-1-méthylbutylamino)-quinoline, N^4 -(7-chloro-4-quinoliny1)-1,4-pentanediamine, 8-(4-amino-1-méthylbutylamino)-6-méthoxy quinoline (primaquine), N^4 -(6-méthoxy-8-quinoliny1)-1,4-pentanediamine, acide quininique, acide quinoline carboxylique, acide ptéroïque, acide nicotinique, acide quinolinique, et dans lequel

- la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus (par exemple histidine) peut être également substituée par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

L'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine ou d'ornithine, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, par des résidus entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ils comportent un noyau imidazole,
- . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,
- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance,

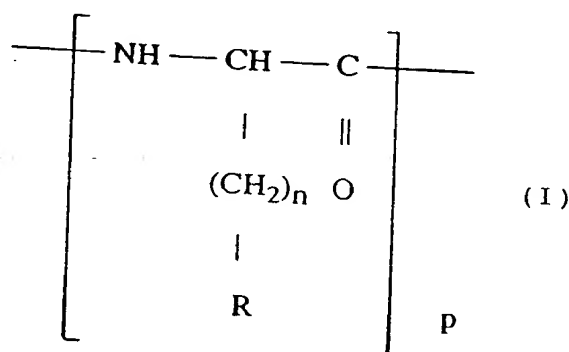
- les fonctions NH_3^+ libres restantes des susdits motifs monomères étant également substituées à raison d'environ 1% à environ 60% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire

cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant une masse moléculaire inférieure à 5000, ce signal de reconnaissance pouvant être présent à raison d'une molécule pour environ 200 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 200 motifs du conjugué polymérique,

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

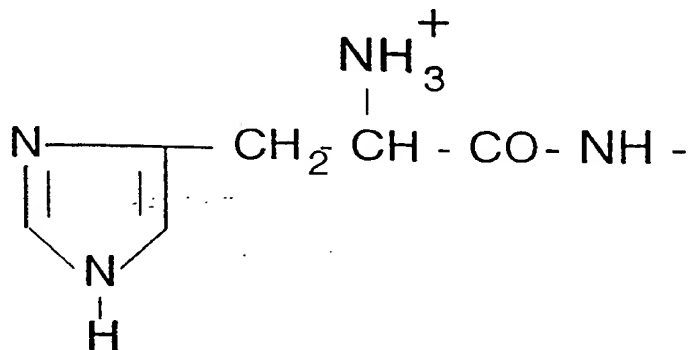
L'expression "non actifs en tant que signal de reconnaissance" signifie que, d'une part, à ce jour, il n'y a pas de récepteurs connus qui soient spécifiques de ces résidus et, d'autre part, que ces résidus ne sont pas utilisés en tant que ligands.

L'invention concerne également un complexe dans lequel le polymère contient un groupement polymérique de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- p est un nombre entier variant de 15 à 900, de préférence de 100 à 300,
- n est un nombre entier variant de 1 à 6, et vaut de préférence 4,
- ce groupement polymérique contient des radicaux R parmi lesquels :
 - . 10% à 45% du nombre de radicaux R représentant un résidu comportant un noyau imidazole et éventuellement une fonction NH_3^+ libre, notamment un résidu histidyle, R pouvant être représenté par la formule :



la fonction NH_3^+ éventuelle des susdits résidus pouvant être également substituée par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance,

5 . 10% à 90% du nombre de radicaux R, représentant les ω -amino NH_3^+ libres, et étant éventuellement substitué à raison de 0 à 50% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, notamment à raison de 0 à 60, avantageusement de 1 molécule pour environ 200 motifs, ou à raison de 2 à 100, avantageusement de 50 molécules pour environ 200 motifs, et/ou

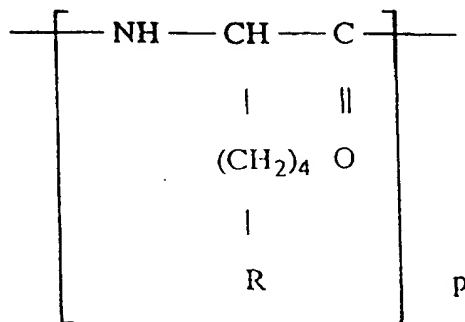
10 . R pouvant en outre être constitué de 0 à 45% par un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, notamment un reste dihydroxypropionoylamido, érythronoylamido, thréonoylamido, ribonoylamido, arabinoylamido, xylonoylamido, lyxonoylamido, gluconoylamido, galactonoylamido, mannonoylamido, glycoheptonoylamido, glycooctonoylamido, m est un nombre entier de 2 à 15, de préférence de 2 à 7, R_1 représente H ou un radical alcoyle de 1 à 15 atomes de carbone, notamment CH_3 , ces radicaux pouvant être substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

Dans cette classe de complexes de l'invention, le polymère est de la polylysine ou de la polyornithine.

25 Comme le montrent les exemples, les cellules HepG2 (hépatocarcinome humain) sont efficacement transfectées par de la polylysine substituée par 70 résidus histidyle.

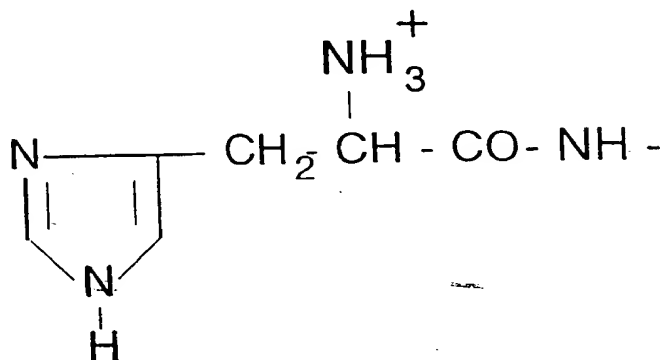
La polylysine substituée par $30 \pm 10\%$ d'histidine a permis de transfecter différentes cellules (humaines et murines) avec une grande efficacité, modulée selon le type cellulaire et le promoteur utilisé.

30 L'invention a également pour objet un complexe dans lequel le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II) suivante :



dans laquelle :

- p a les significations indiquées ci-dessus,
- 10% à 45% du nombre de radicaux R représentent un résidu comportant un noyau imidazole et éventuellement une fonction NH_3^+ libre, notamment un résidu histidyle, R pouvant être représenté par la formule



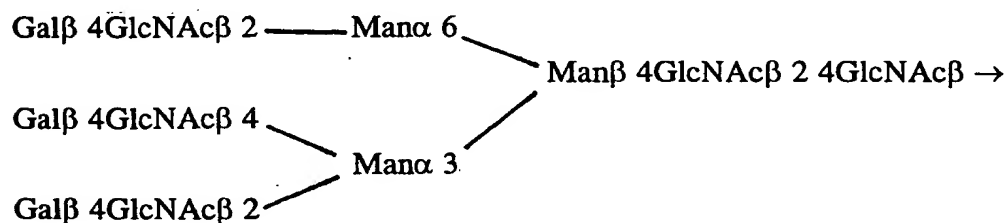
les fonctions NH_3^+ des susdits résidus pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance,

- le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre de radicaux R, représentant les ω -amino NH_3^+ , et de 0% à 45% des radicaux R pouvant être substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

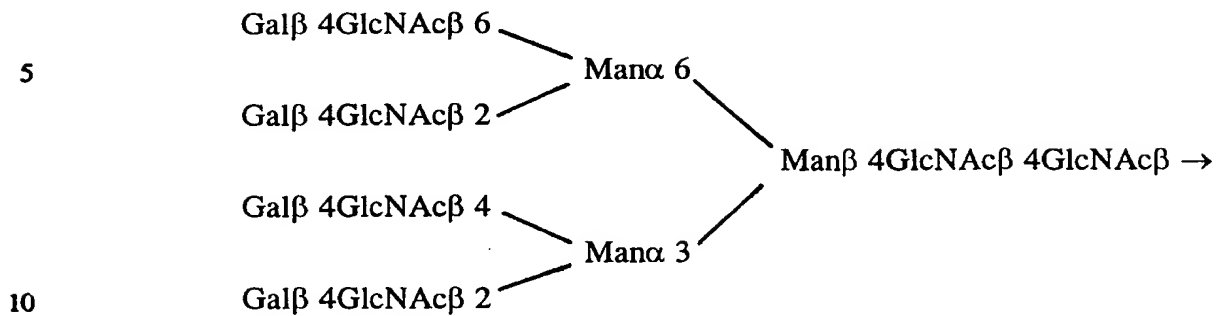
L'invention a également pour objet un complexe qui se caractérise en ce que le signal de reconnaissance est choisi parmi:

A) - des osides simples ou complexes reconnus par des lectines membranaires, et choisis parmi:

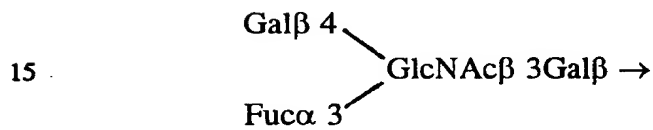
- a. Asialo-oligoside de type triantennaire lactosamine: récepteur d'asialoglycoprotéine



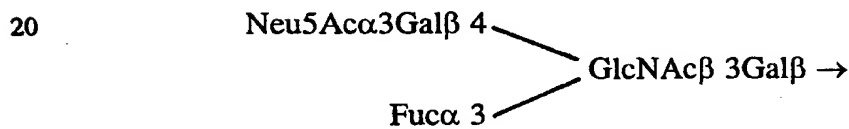
b. Asialo oligoside de type lactosamine tetraantennaire: récepteur d'asialoglycoprotéine



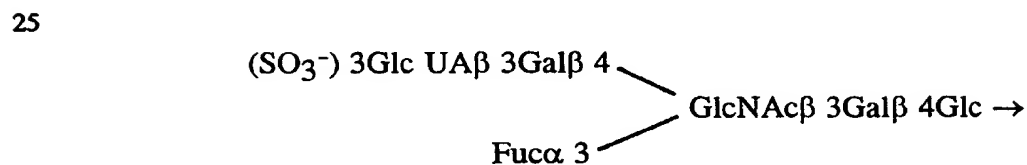
c. Lewis x: LECAM 2/3



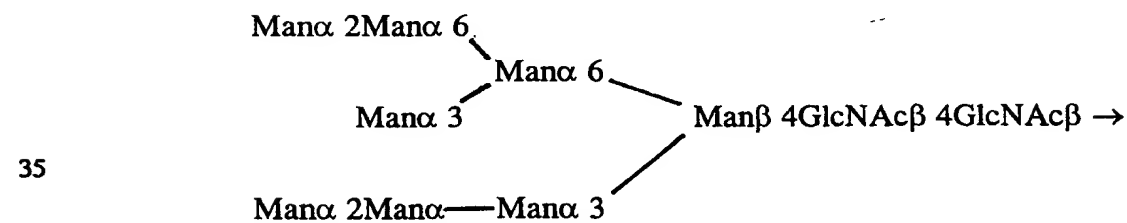
d. Lewis x sialyl: LECAM 3/2



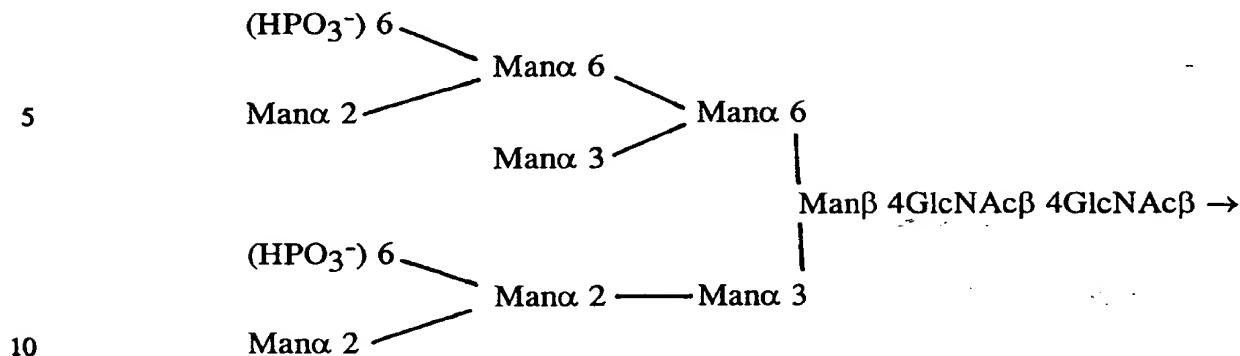
e. Dérivé de Lewis x sulfaté (HNK1): LECAM 1



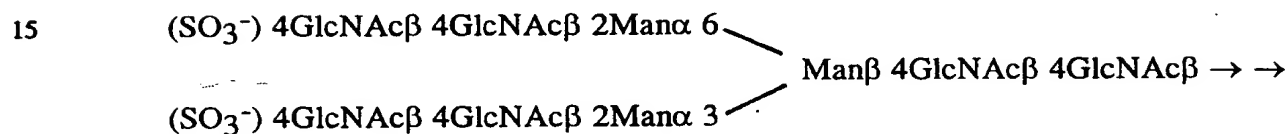
f. Oligomannoside: récepteur du mannose



g. Oligomannoside phosphorylé: récepteur de mannose 6 phosphate



h. Oligosaccharide de type lactosamine sulfaté: récepteur de GalNAc 4 sulfaté



B) des peptides

20

a. peptides anti-inflammatoires ou certains de leurs fragments reconnus par des récepteurs de la paroi vasculaire, tels que

25

- polypeptide vasodilatateur intestinal (VIP)

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSILN-NH₂

- polypeptide atrial natriurétique (ANP)

SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY

- lipocortine

HDMNKVLDL

30

- bradykinine

RPPGFSPFR;

b. peptides ligands des intégrines, tels que les peptides contenant la séquence RGD, ligand de la fibronectine;

35

c. facteurs chimiotactiques, tels que les formyl peptides et leurs antagonistes:

FMLP, (N-formyl-Met-Leu-Phé);

d. hormones peptidiques tels que

l' α -MSH: Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH₂ et leurs antagonistes.

C) Métabolites naturels tels que:

- 5
- la biotine,
 - la carnitine.
 - le tétrahydrofolate et l'acide folique pouvant être à la fois un signal de reconnaissance vis-à-vis de certaines cellules possédant les récepteurs appropriés et un déstabilisateur des membranes cellulaires.

10 L'invention concerne également un complexe qui se caractérise en ce que l'acide nucléique peut être choisi parmi:

a) des gènes marqueurs, tels que

- 15
- gènes contenant la luciférase,
 - protéine verte de la méduse *Aequorea victoria*,
 - gènes contenant la β -galactosidase,
 - gènes contenant la chloramphénicol acétyl transférase,
 - gènes conférant la résistance à un antibiotique, tels que l'hygromycine, la néomycine etc...;

b) des gènes à visée thérapeutique, tels que

- 20
- récepteurs des lipoprotéines de faible densité, déficient dans les cas d'hypercholestérolémie,
 - facteurs de coagulation: facteurs VIII et IX,
 - phénylalanine-hydroxylase (phénylcétonurie),
 - adénosine désaminase (immunodéficiences ADA),
 - 25 - enzymes lysosomiques, telles que la β -glucosidase dans le cas de la maladie de Gaucher,
 - dystrophine et minidistrophine (myopathie),
 - tyrosine hydroxylase (Parkinson),
 - facteurs de croissance des neurones (Alzheimer),
 - 30 - CFTR cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator (mucoviscidose),
 - alpha1-antitrypsine,
 - cytokines (interleukines, TNF facteur de nécrose des tumeurs),
 - thymidine kinase du virus Herpes simplex,
 - 35 - protéines du MHC, système majeur d'histocompatibilité, en particulier les HLA-B7,
 - cytosine désaminase,
 - gènes codant pour des ARN sens et antisens,

- gènes codant pour des ribozymes,
- c) des gènes à visée vaccinale
 - gènes codant pour des antigènes viraux (vaccination), par exemple:
gène codant pour la nucléoprotéine du virus de la grippe.

5 L'invention a également pour objet un complexe dans lequel:

- le polymère, notamment la polylysine présente un degré de polymérisation d'environ 15 à environ 900, de préférence 200,
- les fonctions NH_3^+ libres des motifs lysine étant substituées dans un rapport de 35% par des résidus histidyle et éventuellement par une molécule
- 10 constituant un signal de reconnaissance pour 1 à 50 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité d'au moins 10^5 l mole^{-1} vis-à-vis du récepteur de la cellule que le complexe doit cibler ou éventuellement par 20 à 100 molécules de signal de reconnaissance pour 200 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité inférieure à 10^5 l mole^{-1} vis-à-vis du
- 15 susdit récepteur,
- l'acide nucléique présente une masse moléculaire d'environ 10^6 à environ 10^8 , notamment de $3 \cdot 10^6$ à $30 \cdot 10^6$,
- le rapport entre le nombre moyen de paires de base de l'acide nucléique par molécule de motif de monomère, notamment la lysine est
- 20 d'environ 0,2 à environ 6, de préférence d'environ 0,4 à environ 0,6.

S'agissant des affinités :

- pour une molécule signal de très haute affinité vis-à-vis de son récepteur ($K_a > 10^7 \text{ l/mole}$), d'environ 0, 5 à 5, avantageusement 1 molécule pour environ 10 000 motifs monomères de polymère substitué soit 1 molécule pour
- 25 environ 50 molécules de polymère substitué;
- pour une molécule signal de haute affinité vis-à-vis de son récepteur (K_a entre 10^5 l/mole et 10^7 l/mole), d'environ 0, 5 à environ 10, avantageusement 1 molécule pour environ 200 motifs monomères de polymère substitué soit 1 molécule pour environ 1 molécule de polymère substitué;
- 30 - pour une molécule signal de moyenne affinité vis-à-vis de son récepteur ($K_a < 10^5 \text{ l/mole}$), d'environ 10 à environ 100, avantageusement 50 molécules pour environ 200 motifs monomères de polymère substitué soit 50 molécules pour environ 1 molécule de polymère substitué.

35 L'invention a également pour objet un conjugué polymérique chargé positivement, contenant des motifs portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ

45 %, notamment de 35 %, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose,

- 5 - les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :
- . ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,
 - . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
 - 10 . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,
- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,
- 15 - les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes:
- . ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
 - . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
 - 20 . les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés pouvant être substitués par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :
- 25 . soit par substitution de certaines fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ des lysines),
- . soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl), et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés, entraînant une
 - 30 diminution de charge,
 - . soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),
 - . soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes
 - 35 cellulaires (par exemple histidine),
- sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

L'invention concerne également un conjugué polymérique tel que défini ci-dessus ou contenant un groupement polymérique tel que défini ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le conjugué polymérique est choisi parmi la polylysine histidylée substituée par du lactose, la polylysine histidylée substituée par un oligoside complexe tel que Lewis^b, la polylysine histidylée substituée par le peptide ANP ou la polylysine histidylée substituée par de la biotine.

La préparation des conjugués polymériques de l'invention peut se faire selon l'une des façons décrites dans les tableaux suivants :

Tableau I : Méthodes de préparation des conjugués polymériques avec des signaux de reconnaissance fixés sur certains motifs monomériques du polymère.

On a indiqué par 1, 2, 3 l'ordre d'introduction respectif des résidus responsables de la déstabilisation, de ceux responsables de la diminution de charge et des signaux de reconnaissance sur le polymère.

méthode	POLYMÈRE		
	résidus		
	responsables de la déstabilisation	responsables de la diminution de charge	signal de reconnaissance
I	1	-	2
II	2	-	1
III	1	2	3
IV	1	3	2
V	2	1	3
VI	3	1	2
VII	2	3	1
VIII	3	2	1

Tableau II : Méthodes de préparation des conjugués polymériques avec des signaux de reconnaissance fixés sur certains résidus responsables de la déstabilisation des membranes.

5 On a indiqué par 1, 2, 3 l'ordre d'introduction respectif des résidus responsables de la déstabilisation, de ceux responsables de la diminution de charge et des signaux de reconnaissance sur le polymère.

POLYMERE			
résidus			
méthode	responsables de la déstabilisation	responsables de la diminution de charge	signal de reconnaissance
IX	1	-	2
X	1	2	3
XI	1	3	2
XII	2	1	3

10 *Tableau III* : Méthodes de préparation des conjugués polymériques avec des signaux de reconnaissance fixés sur certains résidus responsables de la diminution de charge.

On a indiqué par 1, 2, 3 l'ordre d'introduction respectif des résidus responsables de la déstabilisation, de ceux responsables de la diminution de charge et des signaux de reconnaissance sur le polymère.

15

POLYMERE			
résidus			
méthode	responsables de la déstabilisation	responsables de la diminution de charge	signal de reconnaissance
XIII	2	1	3
XIV	3	1	2
XV	1	2	3

Les résidus responsables de la déstabilisation des membranes sont choisis parmi: histidine, 4-carboxyméthyl-imidazole, 3-(1-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 3-(1-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 2-carboxy-imidazole, histamine, acide 3-(imidazol-4yl)-L-lactique, 2-(1-méthyl-imidazol-4yl)-éthylamine, 2-(3-méthyl-imidazol-4yl)-éthylamine, β -alanyl-histidine, 7-chloro-4(amino-1-méthylbutylamino)-quinoline, N^4 -(7-chloro-4-quinoliny)-1,4-pentanediamine, 8-(4-amino-1-méthylbutylamino)-6-méthoxy-quinoline, N^4 -(6-méthoxy-8-quinoliny)-1,4-pentanediamine, acide quininique, acide quinoline carboxylique, acide ptéroïque, acide nicotinique, acide quinolinique.

Les résidus responsables de la diminution de charge sont choisis parmi: dihydropropionyle, érythronoyle, thréonoyle, ribonoyle, arabinoyle, xylonoyle, lyxonoyle, gluconoyle, galactonoyles, mannonoyle, glycoheptonoyle, glycooctonoyle.

Les signaux de reconnaissance sont choisis parmi : des osides, des oligosides, des peptides, des métabolites, des agonistes, des antagonistes.

A titre d'exemple nous décrivons différentes méthodes des tableaux :

1) Les signaux de reconnaissance sont fixés sur certains motifs monomériques du polymère après l'introduction des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires de la façon suivante :

A) Méthode I

polylysine nicotinylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. Par exemple, la polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'acide nicotinique) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

b) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains groupements ϵ -aminés des résidus lysyles du polymère.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine nicotinylée, on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Des osides simples sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ε-aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871-878).

2) fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylisothiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1, 269-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ε-aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21 : 871-878).

polylysine histidylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺ libre sont partiellement substitués par des résidus comportant une fonction permettant la fixation ultérieure d'autres molécules telles que celles qui constitueront un signal de reconnaissance, par exemple, après réaction en milieu organique avec un ester N-hydroxysuccinimide de l'acide dithiopyridine propionate ou de ses dérivés.

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺ libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple, après réaction en milieu organique avec l'histidine dont le groupe αNH₃⁺ et le groupe NH du noyau imidazole sont protégées par du tertiobutyloxycarbonyl en présence d'un agent de couplage tel que l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium. Après réaction et purification, les fonctions aminées des résidus histidyles du polymère obtenu sont déprotégées.

c) Les signaux de reconnaissance sont liés aux groupements dithiopyridyles du polymère.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Les osides simples dérivés en glycopeptides avec une fonction dithiopyridyle (pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine) selon une méthode

décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275) sont réduits et fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur les fonctions dithiopyridyles du polymère.

2) fixation d'oligosides

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis dérivés en glycopeptides avec une fonction dithiopyridyle (pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine) selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275) sont réduits et fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur les fonctions dithiopyridyles du polymère.

B) Méthode III

polylysine nicotinylée et gluconoylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺ libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. Par exemple la polylysine gluconoylée est dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'acide nicotinique) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺ encore libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et d'un acide organique hydroxylé activé (notamment la δ -gluconolactone).

c) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains groupements ϵ -aminés des résidus lysyles du polymère.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Des osides simples sous la forme de dérivés phénylthiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871-878).

2) fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylthiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:69-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylthiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21:871-878).

C) Méthode V

polylysine gluconoylée et histidylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus comportant une fonction permettant la fixation ultérieure d'autres molécules. S'agissant de la fixation de signaux de reconnaissance, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et de l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide dithiopyridine propionate ou de ses dérivés.

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ encore libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et d'un acide organique hydroxylé activé (notamment la δ -gluconolactone).

c) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ encore libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. S'agissant de la fixation de résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'histidine dont le groupe αNH_3^+ et le groupe NH du noyau imidazole sont protégées par du tertiobutyloxycarbonyl) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium). Après purification, les fonctions aminées protégées des résidus histidyle sont déprotégées.

d) Les signaux de reconnaissance sont liés aux groupements dithiopyridyles du polymère.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Les osides simples dérivés en glycopeptides avec une fonction dithiopyridyle (pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine) selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275) sont réduits et fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur les fonctions dithiopyridyles du polymère.

2) fixation d'oligosides

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis dérivés en glycopeptides avec une fonction dithiopyridyle (pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine) selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275) sont réduits et fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur les fonctions dithiopyridyles du polymère.

polylysine gluconoylée et nicotinylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ encore libre sont partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et d'un acide organique hydroxylé activé (notamment la δ -gluconolactone).

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. Par exemple la polylysine gluconoylée est dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'acide nicotinique) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

c) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains groupements ϵ -aminés des résidus lysyles du polymère.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Des osides simples sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871-878).

2) fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylisothiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21:871-878).

II) Les signaux de reconnaissance sont fixés sur certains motifs monomériques du polymère avant l'introduction des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires de la façon suivante :

5 A) Méthode II

polylysine nicotinylée

Ces substitutions suivent l'un quelconque des protocoles connus de l'homme de l'art.

10 a) A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

15 Des osides simples sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ε-aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871-878).

2) fixation d'oligosides.

20 Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylisothiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1, 269-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ε-aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21:871-878).

30 b) S'agissant de la fixation des résidus entraînant la déstabilisation des membranes, par exemple la polylysine substituée par des osides ou des oligosides est dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'acide nicotinique) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

35

B) Méthode VI

polylysine gluconoylée et nicotinylée

Ces substitutions suivent l'un quelconque des protocoles connus de l'homme de l'art.

5 a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ encore libre sont partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le

10 diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et d'un acide organique hydroxylé activé (notamment la δ -gluconolactone).

b) A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine gluconoylée dissoute dans un solvant organique (notamment le

15 diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Des osides simples sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine

20 comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871-878).

2) fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylisothiocyanates

25 de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohyd. Letters 1:269-275). Les glycopeptides sous la forme de

30 dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21:871-878).

c) S'agissant de la fixation des résidus entraînant la déstabilisation des membranes, par exemple la polylysine substituée par des osides ou des

35 oligosides est dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'acide nicotinique) et d'un agent de couplage

(notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

III) les signaux de reconnaissance sont fixés sur certains résidus déstabilisants.

5

A) Méthode IX

polylysine histidylée

10

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. Par exemple, après réaction en milieu organique avec l'histidine dont le groupe NH_3^+ et le groupe NH du noyau imidazole sont protégées par du tertibutyloxycarbonyl en présence d'un agent de couplage tel que l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium. Après réaction et purification, les fonctions aminées des résidus histidyle du polymère obtenu sont déprotégées.

15

b) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains groupements NH_3^+ des résidus entraînant une déstabilisation des membranes.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'oligosides.

20

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides de types triantennaire ou tétraantennaire ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylisothiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur certaines fonctions NH_2 des résidus histidyles. A ce pH, la fixation sur les NH_3^+ lysines est très faible, voire impossible.

25

B) Méthode XII

30

polylysine gluconoylée et histidylée

35

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et d'un acide organique hydroxylé activé (notamment la δ -gluconolactone).

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ encore libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. S'agissant de la fixation de résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'histidine dont le groupe αNH_3^+ et le groupe NH du noyau imidazole sont protégées par du tertiobutyloxycarbonyl) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium). Après purification, les fonctions aminées protégées des résidus histidyles sont déprotégées.

c) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains groupements NH_3^+ des résidus entraînant une déstabilisation des membranes.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylisothiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur certaines fonctions αNH_2 des résidus histidyles ; à ce pH, la fixation sur les NH_3^+ lysines est très faible, voire impossible.

C) Méthode IX

polylysine imidazolée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. S'agissant de la fixation de résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment le 4-carboxyméthyl-imidazole) et d'un agent

de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

b) Les signaux de reconnaissance sont liés sur certains noyaux imidazole des résidus entraînant une déstabilisation des membranes.

5 A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine imidazolée, on indique ci-après la fixation de peptides ou des glycopeptides.

10 Les résidus imidazole peuvent être facilement alkylés en milieu neutre par des composés possédant un groupement activé tel que par exemple, l'iodoacétamide ou ses dérivés ; ceci est connu depuis les travaux de Korman S. et Clarke H.T. en 1956 (J. Biol. Chem. 113:133). L'alkylation des imidazoles par un dérivé de l'iodoacétamide s'effectue à pH voisin de la neutralité, 7,0 par exemple. A ce pH, les groupes ε-aminés de la lysine ne sont pas affectés, ils le seraient à pH beaucoup plus alcalin 9 ou au delà. Les signaux de reconnaissance
15 de nature peptidique ou glycopeptidique (Monsigny *et al.*, Brevet Français 9407738. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications et Sdiqui *et al.*, 1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohyd. Letters 1:269-275) peuvent être facilement substitués par un groupement iodoacétamide. Les dérivés du type ICH_2CONHR : $\text{I-CH}_2\text{-CO-NH-peptide}$ ou $\text{I-CH}_2\text{-CO-NH-glycopeptide}$, sont fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur l'azote 3 et avec une efficacité moindre sur l'azote 1, conduisant à des dérivés *N*-carboxyméthyl stables. On peut également utiliser
20 des dérivés du bromoacétamide qui sont également d'excellents réactifs pour alkyler des résidus imidazole (voir par exemple Henrikson *et al.*, 1965 J. Biol. Chem. 240:2921). Ce type de substitution, sous réserve de substituer un faible nombre de résidus imidazole par des signaux de reconnaissance ayant une haute affinité suffisante pour leur récepteur, ne fait pas perdre au polymère substitué par des résidus imidazole sa capacité destabilisatrice des membranes à pH légèrement acide.

30 *IV). Les signaux de reconnaissance sont fixés sur certains résidus neutralisants.*

A) Méthode XIII

polylysine gluconoylée et imidazolée

35 a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le

diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et par deux acides organiques hydroxylés activés (notamment la 6-désoxy-6-iodo- δ -gluconolactone pour une part et la δ -gluconolactone pour 10 à 50 parts).

5 b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. S'agissant de la fixation de résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant
10 organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment le 4-carboxyméthyl-imidazole) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

15 c) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains des résidus neutralisants.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine gluconoylée et histidylée, on indique ci-après la fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou
20 tétraantennés ou Lewis dérivés en glycopeptides avec une fonction dithiopyridyle (*pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine*) selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-
25 amino acid conjugates. Carbohyd. Letters 1:269-275) sont réduits par le triscarboxyéthylphosphine en milieu neutre (pH voisin de 7,0) par exemple et fixés en milieu aqueux tamponné à pH légèrement alcalin (aux environs de pH 8,5) sur les résidus 6-désoxy-6-iodo-gluconoyle du polymère. Ce type de substitution, sous réserve de substituer un faible nombre de résidus imidazole
30 par des signaux de reconnaissance ayant une haute affinité pour leur récepteur, ne fait pas perdre au polymère substitué par des résidus imidazole sa capacité déstabilisatrice des membranes à pH légèrement acide.

B) Méthode XIII

polylysine gluconoylée et imidazolée

35 a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme

de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et par deux acides organiques hydroxylés activés (notamment la 6-bromoacétamido-L-gulono-1,5 lactone pour une part et la
5 δ -gluconolactone pour 10 à 50 parts). La 6-bromoacétamido-L-gulono-1,5 lactone est obtenue après réduction par le cyanoborohydrure de l'imine obtenue en mélangeant une solution ammoniacale (NH_4OH ou $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) et une solution d'acide uronique, l'acide glucuronique par exemple, puis par acylation de l'amine par un bromoacétate activé, par exemple l'anhydride bromoacétique
10 ou le bromo acétate de succinimide.

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. S'agissant de la fixation de résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple un sel de polylysine
15 (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment le 4-carboxyméthyl-imidazole) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).
20

c) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains des résidus neutralisants.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine gluconoylée et histidylée, on indique ci-après la fixation d'oligosides.

25 Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis dérivés en glycopeptides avec une fonction dithiopyridyle (*pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine*) selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de
30 préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275) sont réduits par le triscarboxyéthylphosphine en milieu neutre (pH voisin de 7,0) par exemple et fixés en milieu aqueux tamponné à pH légèrement alcalin (aux environs de pH 8,5) sur les résidus bromoacétamido gulonyle du polymère. Ce type de
35 substitution, sous réserve de substituer un faible nombre de résidus imidazole par des signaux de reconnaissance ayant une haute affinité pour leur récepteur, ne fait pas perdre au polymère substitué par des résidus imidazole sa capacité déstabilisatrice des membranes à pH légèrement acide.

Le complexe acide nucléique/conjugué polymérique est obtenu en mélangeant une solution de l'acide nucléique concerné et une solution du conjugué polymérique. De préférence, lesdites solutions sont préparées à partir du sérum physiologique ou d'un tampon ou d'un milieu cytocompatible.

5 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, on utilise un complexe tel que décrit ci-dessus ou un conjugué tel que décrit ci-dessus pour la transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* de cellules à l'aide d'un gène, notamment ceux définis précédemment.

10 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, on utilise un complexe ou un conjugué tels que décrits ci-dessus, se caractérisant en ce que les cellules sont choisies parmi:

- des cellules souches hématopoïétiques;
- des cellules dendritiques;
- cellules du foie;
- 15 - cellules des muscles squelettiques;
- cellules de la peau:
 - . fibroblastes,
 - . kératinocytes,
 - . cellules dendritiques,
 - 20 . mélanocytes.
- cellules des parois vasculaires;
 - . endothéliales;
 - . musculaires lisses;
- cellules épithéliales des voies aériennes;
- 25 - cellules du système nerveux central;
- cellules cancéreuses;
- cellules du système immunitaire, telles que des lymphocytes, des macrophages, des cellules NK etc...

30 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la méthode de transfection *in vitro* ou *ex vivo*, se caractérise en ce que l'on met en présence un complexe tel que décrit précédemment dans un milieu contenant des cellules à transfecter, dans des conditions telles qu'il y a:

- passage du complexe à partir du milieu dans le cytoplasme des cellules,
- 35 - relargage de l'acide nucléique impliqué dans le susdit complexe dans le cytosol et/ou le noyau des cellules,
- transcription et expression de l'acide nucléique dans les cellules transfectées,

- expression de la protéine correspondant au gène transfecté.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique, qui se caractérise en ce qu'elle comprend à titre de substance active, l'un au moins des complexes tels que décrits ci-dessus, ou l'un au moins des conjugués tels que décrits ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, on utilise un complexe tel que décrit ci-dessus ou un conjugué tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné par exemple au traitement de déficience métabolique congénitale ou acquise, ou au traitement de tumeurs, ou pour la préparation d'un vaccin, par exemple vaccin contre la grippe.

L'invention a également pour objet une trousse ou un kit comprenant:

- un conjugué polymérique tel que décrit ci-dessus, tel que la polylysine, substituée par un résidu entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, ce conjugué polymérique étant apte à comporter éventuellement un signal de reconnaissance, lequel est préalablement fixé ou non sur le susdit conjugué polymérique, ledit signal de reconnaissance étant fonction de la cellule à cibler,

- éventuellement un plasmide contenant au moins un gène à transférer, et éventuellement le système de régulation de l'expression du susdit gène,

- des réactifs permettant la fixation éventuelle du signal de reconnaissance sur le susdit conjugué polymérique,

- des réactifs permettant la formation d'un complexe tel que décrit ci-dessus, ou entre le conjugué polymérique et le gène à transférer, ou entre le conjugué polymérique et un plasmide contenant le gène à transférer,

- des réactifs permettant la transfection de la cellule par le susdit complexe.

DESCRIPTION DES FIGURES :

Figure 1

Elle représente un fragment de polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle.

Figure 2

Elle représente le spectre RMN à 300 MHz dans D₂O de la polylysine (DP 190) substituée par 70 résidus histidyle :

1,28 à 1,88 ppm : 6 protons des carbones 3, 4 et 5 des lysines substituées ou non substituées.

2,39 ppm : protons du groupe CH₃ du *p*-toluène sulfonate

2,75 ppm : trace de DMSO

5 2,99 ppm : 2 protons du carbone 6 d'un résidu lysyle non substitué

3,15 ppm : 2 protons du carbone 6 d'un résidu lysyle substitué

3,35 ppm : 2 protons du carbone 9 d'un résidu histidyle

4,36 ppm : 2 protons des carbones 2 et 8

4,78 ppm : pic de l'eau

10 7,36 ppm : 2 protons (doublet, constante de couplage en ortho = 7,97 Hz)
des protons des carbones 2 et 6 du cycle aromatique du *p*-toluène sulfonate

7,42 ppm : 1 proton du carbone 11 d'un résidu histidyle

7,71 ppm : 2 protons (doublet, constante de couplage en ortho = 8,01 Hz)
des protons des carbones 3 et 5 du cycle aromatique du *p*-toluène sulfonate

15 8,7 ppm : 1 proton du carbone 12 d'un résidu histidyle.

Figure 3

Elle concerne la préparation de la polylysine (DP 190) partiellement substituée par 70 résidus histidyle.

20 La poly-L-lysine sous forme bromhydrate (masse moléculaire moyenne 40 000 ; degré de polymérisation moyen 190) (1 g dans 200 ml H₂O) provenant de chez Bachem Feinchemikalien (Budendorf, Suisse) est d'abord passée sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 2 x 8, forme OH⁻ ; 35 x 2,5 cm) dans le but d'enlever le bromure qui est toxique pour les cellules. La solution de
25 polylysine est neutralisée avec une solution d'acide *p*-toluène sulfonique à 10% dans l'eau puis lyophilisée.

La polylysine est partiellement substituée avec des résidus histidyle comme suit : la polylysine sous forme *p*-toluène sulfonate (50 mg ; 0,96 μmoles) dissoute dans 3 ml de DMSO (diméthylsulfoxyde) en présence de
30 diisopropyléthylamine (42 μl ; 288 μmoles), est mise à réagir pendant 24 heures à 20°C avec 32 mg de (Boc)His(Boc)-OH (96 μmoles) en présence de 43 mg d'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylaminophosphonium (BOP) (97 μmoles). Les résidus histidyle sont ensuite déprotégés en présence de 20 ml d'un mélange eau et acide trifluoroacétique (TFA) (50/50 V/V) pendant
35 24 heures à 20°C. L'eau et le TFA sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Le polymère est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau

distillée et la solution est lyophilisée. Le nombre x de résidus histidyle fixé par molécule de polylysine est déterminé par RMN du proton comme suit :

$$x = 6(h_{8.7} / h_{Lys})DP$$

où $h_{8.7}$ est l'intégrale du pic à 8,7 ppm correspondant au proton du carbone 12 d'un résidu histidyle, h_{Lys} est l'intégrale des pics entre 1,28 et 1,88 ppm correspondant aux 6 protons des carbones 3, 4 et 5 des résidus lysine et DP est le degré de polymérisation de la polylysine (DP = 190). Le nombre de résidus histidyle fixé par molécule de polylysine est x , $x = 70$ dans la préparation décrite ci-dessus.

Figure 4

Elle représente le transfert de gènes dans les cellules HepG2 en utilisant la polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle (HispLK).

Les complexes ADN/HispLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μ g dans 0,7 ml de DMEM) et la polylysine substituée par 70 résidus histidyle (40 μ g dans 0,3 ml de DMEM). Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée avec 5% de sérum bovin foetal. Les complexes ADN/pLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μ g dans 0,7 ml de DMEM) et la polylysine (5 μ g dans 0,3 ml de DMEM). Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée avec 5% de sérum bovin foetal et éventuellement avec 100 μ M de chloroquine (+ chloro) ou 20 μ M d'un peptide fusiogène (+ E5CA) (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCA). Le milieu dans lequel les cellules HepG2 (3 x 10⁵ cellules/4 cm²) ont poussé pendant 24 heures, est éliminé et remplacé par une solution (1 ml) contenant un complexe ADN/polymère (5 μ g/ml d'ADN). Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant, pendant 4 secondes la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de la lumière émise exprimées en unités arbitraires) dans les lysats cellulaires.

Dans ces conditions, 1 pg/ml de luciférase produit 2000 RLU.

En allant de gauche à droite sur l'axe des abscisses, le premier rectangle correspond au complexe ADN/polylysine histidylée, le deuxième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine, le troisième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine additionné de chloroquine, le quatrième rectangle

correspond au complexe ADN/polylysine additionné du peptide fusiogène E5CA.

En encadré : variation de l'efficacité de transfection en fonction de la quantité de plasmide.

5

Figure 5

Elle concerne le transfert de gènes dans les cellules HepG2 en utilisant la polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle. Elle représente l'influence du nombre de résidus histidyle fixé par molécule de polylysine sur l'efficacité de la transfection.

10

En allant de gauche à droite sur l'axe des abscisses, le premier rectangle correspond au complexe ADN/polylysine non substitué, le deuxième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine substitué par 19 résidus d'histidyle, le troisième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine substitué par 30 résidus d'histidyle, le quatrième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine substitué par 46 résidus d'histidyle, le cinquième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine substitué par 63 résidus d'histidyle, le sixième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine substitué par 70 résidus d'histidyle et le septième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine substitué par 84 résidus d'histidyle.

15

20

Les complexes ADN/HisPLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μ g dans 0,7 ml de DMEM) et la polylysine substituée par un nombre variable de résidus histidyle (40 μ g dans 0,3 ml de DMEM). Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée avec du sérum bovin foetal (concentration finale 10%). Le milieu dans lequel les cellules HepG2 (3×10^5 cellules/4 cm²) ont poussé pendant 24 heures, est éliminé et remplacé par une solution (1 ml) contenant un complexe ADN/polymère (5 μ g/ml d'ADN). Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant, pendant 4 secondes, la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de la lumière émise exprimées en unités arbitraires) dans les lysats cellulaires.

25

30

35

Dans ces conditions, 1 pg/ml de luciférase produit 2000 RLU.

Figure 6

Elle concerne le transfert de gènes dans les cellules HOS en utilisant la polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle. Elle représente l'influence sur l'efficacité de la transfection du rapport ADN/polymère (exprimé sur les abscisses en μg de polymère pour 10 μg d'ADN) dans les complexes pCMVLUC/His₈₄pLK.

Les complexes ADN/HispLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μg dans 0,7 ml de DMEM) et différentes quantités de polylysine substituée par 84 résidus histidyle dans 0,3 ml de DMEM. Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée avec 1% de sérum bovin foetal. Le milieu dans lequel les cellules HOS (2×10^5 cellules/4 cm²) ont poussé pendant 24 heures est éliminé et remplacé par une solution (1 ml) contenant un complexe ADN/polymère (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN). Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant pendant 4 secondes la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de la lumière émise exprimées en unités arbitraires) dans les lysats cellulaires.

Dans ces conditions, 1 pg/ml de luciférase produit 2000 RLU.

Figure 7

Elle concerne le transfert de gènes dans les cellules HepG2 en utilisant la polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle. Elle représente l'influence du temps d'incubation (exprimé en heures sur les abscisses) des complexes pCMVLUC/His₇₀pLK avec les cellules sur l'efficacité de la transfection. Les complexes ADN/HispLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μg dans 0,7 ml de DMEM) et la polylysine substituée par 70 résidus histidyle (40 μg dans 0,3 ml de DMEM). Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée à 10% avec du sérum bovin foetal. Le milieu dans lequel les cellules HepG2 (3×10^5 cellules/4 cm²) ont poussé pendant 24 heures est éliminé et remplacé par une solution (1 ml) contenant un complexe ADN/polymère (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN). Après les différents temps d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant, pendant 4 secondes la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de la lumière émise exprimées en unités arbitraires) dans les lysats cellulaires.

Dans ces conditions, 1 pg/ml de luciférase produit 2000 RLU.

Figure 8

Elle concerne le transfert de gènes dans les cellules HepG2 en utilisant la polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle. Elle représente l'influence sur l'efficacité de la transfection de la quantité de sérum bovin foetal (exprimé sur l'axe des abscisses en % de sérum dans le milieu utilisé) présent pendant l'incubation des complexes pCMVLUC/His70pLK avec les cellules. Les complexes ADN/HispLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 µg dans 0, 7 ml de DMEM) et la polylysine substituée par 70 résidus histidyle (40 µg dans 0, 3 ml de DMEM). Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée avec différentes quantités de sérum bovin foetal. Le milieu dans lequel les cellules HepG2 (3×10^5 cellules/4 cm²) ont poussé pendant 24 heures, est éliminé et remplacé par une solution (1 ml) contenant un complexe ADN/polymère (5 µg/ml d'ADN). Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant, pendant 4 secondes la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de la lumière émise exprimées en unités arbitraires) dans les lysats cellulaires.

Dans ces conditions, 1 pg/ml de luciférase produit 2000 RLU.

Figure 9

Elle concerne le transfert de gènes dans différentes lignées cellulaires en utilisant la polylysine (DP 190) substituée par 84 résidus histidyle. Les complexes ADN/HispLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 µg dans 0, 7 ml de DMEM) et de la polylysine substituée par 84 résidus histidyle dans 0, 3 ml de DMEM. Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée à 10% avec du sérum bovin foetal. Le milieu dans lequel les cellules ($2-3 \times 10^5$ cellules/4 cm²) ont poussé pendant 24 heures, est éliminé et remplacé par une solution contenant un complexe ADN/polymère (5 µg/ml d'ADN). Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant, pendant 4 secondes la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de la lumière émise exprimées en

unités arbitraires) dans les lysats cellulaires. HepG2 = lignée de cellules dérivant d'un hépatocarcinome humain ; HOS = lignée de cellules dérivant d'un ostéosarcome humain; MCF-7 ; lignée de cellules dérivant d'un adénocarcinome humain ; B16 = lignée de cellules dérivant d'un mélanome murin ; COS =
5 lignée de cellules dérivant de cellules de reins de singe transformées par SV40 ; Rb1 = lignée de cellules dérivant de cellules musculaires lisses d'aorte de lapin ; HeLa = lignée de cellules épithéloïdes humaines ; 16 HBE = lignée de cellules épithéliales des voies respiratoires humaines normales ; Σ CFTE =
10 lignée de cellules épithéliales des voies respiratoires humaines déficientes pour le gène responsable de la mucoviscidose (CFTR).

Préparation de la polylysine histidylée substituée par le lactose

- préparation de la polylysine substituée par des groupements thiol activés

La polylysine sous forme hydrobromide (masse moléculaire moyenne
15 40 000 ; degré de polymérisation moyen 190) (1 g dans 200 ml H₂O) provenant de chez Bachem Feinchemikalien (Budendorf, Suisse) est d'abord passée sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 2 x 8, forme OH⁻ ; 35 x 2,5 cm) dans le but d'enlever le bromure qui est toxique pour les cellules. La solution de polylysine est neutralisée avec une solution d'acide *p*-toluène sulfonique à 10%
20 dans l'eau puis lyophilisée.

La polylysine *p*-toluène sulfonate (50 mg ; 0,91 μ mol) est dissoute dans 2 ml de DMSO et mise à réagir à 20°C pendant 12 h avec l'ester N-hydroxysuccinimide du 4-carbonyl- α -methyl- α -(2-pyridinyldithio) toluène (SMPT, Pierce, USA) (5,3 mg ; 13,6 μ mol). La polylysine substituée par des
25 groupes carbonyl α -méthyl- α -(2-pyridinyldithio)toluène (=MPT-pLK) est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau distillée et la solution est lyophilisée. Le nombre moyen de molécules de MPT lié par molécule de
30 polylysine est déterminé par absorbance à 343 nm de la pyridine thione ($\epsilon = 8080 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) libérée par réduction quantitative de la liaison disulfure à l'aide de (TCEP : tris-carboxyéthylphosphine) : le nombre moyen de MPT par molécule de polylysine est 10.

- préparation de la polylysine histidylée substituée par des groupements thiol activés.

35

La polylysine sous forme *p*-toluène sulfonate substituée par 10 résidus MPT (50 mg ; 0,96 μ moles) dissoute dans 3 ml de DMSO (diméthylsulfoxyde) en présence de diisopropyléthylamine (42 μ l ; 288 μ moles), est mise à réagir

pendant 24 heures à 20°C avec 32 mg de (Boc)His(Boc)-OH (80 μ moles) en présence de 43 mg d'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytris-diméthylaminophosphonium (BOP) (97 μ moles). Les résidus histidyle sont ensuite déprotégés en présence de 20 ml d'un mélange eau et acide trifluoroacétique (TFA)(50/50 V/V) à 50% pendant 24 heures à 20°C. L'eau et le TFA sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Le polymère est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau distillée et la solution est lyophilisée. Le nombre de résidus histidyle fixé par molécule de polylysine, déterminé par RMN du proton est 60.

- réduction du dithiopyridyle

L'oligoside est d'abord transformé en glycopeptide selon une méthode décrite dans la demande de Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. (1994) Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications).

Le glycopeptide est fixé sur la polylysine partiellement histidylée via un pont disulfure.

Le Gal β 4Glc β -pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine (3 μ mol) est traité par 3,5 μ mole de TCEP (tris-carboxyéthylphosphine) dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7 (1 ml), pendant 1 h à 20°C. Cette solution est ajoutée à la polylysine partiellement histidylée substituée par 10 résidus MPT (10 mg ; 0,2 μ moles) dissoute dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7 (1 ml). Après 1 h à 20°C, le polymère est précipité par addition de 10 volumes d'isopropanol. Le précipité est récupéré après centrifugation (1 800 g, 15 min) et lavé dans l'isopropanol puis dissous dans l'eau et lyophilisé.

Le rendement de la réaction de couplage dans les conditions utilisées est égal ou supérieur à 90%.

Préparation de la polylysine histidylée et substituée par un oligoside complexe : le Lewis^b

Exemple du Lewis^b = Fuc α 4(Fuc α 2Gal β 3)GlcNAc β 3Gal β 4Glc

Les oligosides complexes ayant un résidu glucose (Glc) ou N-acétyl glucosamine (GlcNAc) en position réductrice sont d'abord transformés en glycopeptides selon une méthode décrite dans la demande de Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. (1994)

Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications).

Les oligosides complexes sont fixés sur la polylysine partiellement histidylée selon une liaison du glycopeptide à la polylysine histidylée via un pont disulfure.

L'oligoside $\text{Fu}\alpha 4(\text{Fu}\alpha 2\text{Gal}\beta 3)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ est dérivé en glycopeptide $\text{Fu}\alpha 4(\text{Fu}\alpha 2\text{Gal}\beta 3)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta$ -pyroglutamyl-R. Le groupe carboxylique du pyroglutamyne est substitué par une fonction dithiopyridine pour donner le glycopeptide : $\text{Fu}\alpha 4(\text{Fu}\alpha 2\text{Gal}\beta 3)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta$ -pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine (demande de Brevet Français 9407738 : Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. (1994) Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications et Quétard *et al.*, Simple synthesis of novel glycosynthons for glycoconjugate preparation : oligosylpyroglutamyl derivatives, en préparation).

-réduction du glycopeptide

Le glycopeptide (2 μmol) est traité par 2,2 μmole de TCEP (tris-carboxyéthylphosphine) dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7 (1 ml), pendant 1 h à 20°C. Cette solution est ajoutée à la polylysine partiellement histidylée substituée par 10 résidus MPT (10 mg ; 0,2 μmoles) dissoute dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7 (1 ml). Après 1 h à 20°C, le polymère est précipité par addition de 10 volumes d'isopropanol. Le précipité est récupéré après centrifugation (1 800 g, 15 min) et lavé dans l'isopropanol puis dissous dans l'eau et lyophilisé.

Le rendement de la réaction de couplage dans les conditions utilisées est égal ou supérieur à 90%.

Préparation de la polylysine histidylée substituée par le peptide ANP

- préparation de la polylysine substituée par des groupements thiol activés

La polylysine sous forme bromhydrate (masse moléculaire moyenne 40 000 ; degré de polymérisation moyen 190) (1 g dans 200 ml H₂O) provenant de chez Bachem Feinchemikalien (Budendorf, Suisse) est d'abord passée sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 2 x 8, forme OH⁻ ; 35 x 2,5 cm) dans le but d'enlever le bromure qui est toxique pour les cellules. La solution de polylysine est neutralisée avec une solution d'acide *p*-toluène sulfonique à 10% dans l'eau puis lyophilisée.

La polylysine *p*-toluène sulfonate (50 mg ; 0,91 μmol) est dissous dans 2 ml de DMSO et mise à réagir à 20°C pendant 12 h avec l'ester N-hydroxysuccinimide du 4-carbonyl- α -methyl- α -(2-pyridinyldithio) toluène

(SMPT, Pierce, USA) (5,3 mg ; 13,6 μ mol). Le polymère (MPT-pLK) est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau distillée et la solution est lyophilisée. Le nombre moyen de molécules de MPT lié par molécule de polylysine est déterminé par absorbance à 343 nm de la pyridine thione ($\epsilon = 8080 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) libérée par réduction quantitative de la liaison disulfure à l'aide de (TCEP) : le nombre moyen de MPT est 10.

- préparation de la polylysine histidylée substituée par des groupements thiol activés.

La polylysine sous forme *p*-toluène sulfonate substituée par 10 résidus MPT (50 mg ; 0,96 μ moles) dissoute dans 3 ml de DMSO (dimethylsulfoxyde) en présence de diisopropyléthylamine (42 μ l ; 288 μ moles), est mise à réagir pendant 24 heures à 20°C avec 32 mg de (Boc)His(Boc)-OH (80 μ moles) en présence de 43 mg d'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylaminophosphonium (BOP) (97 μ moles). Les résidus histidyle sont ensuite déprotégés en présence de 20 ml d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 50% pendant 48 heures à 20°C. L'eau et le TFA sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Le polymère est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau distillée et la solution est lyophilisée. Le nombre x de résidus histidyle fixé par molécule de polylysine, déterminé par RMN du proton est 60.

- réduction du peptide ANP

Le peptide ANP (CYSLRRSSAFGGRIDRIGAQSA) ayant sa cystéine en position N-terminale protégée sous forme thiopyridinyle (7,5 mg ; 2 μ mol) est mis à réagir à 20°C pendant 15 minutes avec du TCEP (0,7 mg ; 2 μ mol) dans 1 ml de tampon 0,1 M NaCl, 0,1 M tris/HCl pH 7,6.

- préparation de la polylysine histidylée substituée avec le peptide ANP

La polylysine partiellement histidylée substituée par 10 molécules de MPT (MPT₁₀-,His₇₀pLK) (10 mg ; 0,2 μ mol) dans 1 ml de tampon 0,1 M NaCl, 0,1 M tris/HCl pH 7,6 est mise à réagir à 20°C pendant 24 heures avec 7,5 mg (2 μ mol) de peptide ANP dont la cystéine a été réduite. Le polymère (ANP-S-, His₇₀-pLK) est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et

5 récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau distillée et la solution est lyophilisée. Le nombre moyen de molécules de peptide ANP fixé par molécule de polymère est déterminé par l'analyse des acides aminés du polymère par chromatographie à haute pression (HPLC) avec une
10 colonne C₁₈ (Supelcosil LC-18-DB, Supelco, Bellefonte, PA, USA) en phase inverse, après hydrolyse du polymère dans HCl 5,6 N à 105°C pendant 72 heures et transformation des acides aminés libérés en dérivés phenylthiohydantoïne (PTH-aa). Le nombre moyen d'ANP par molécule de polymère est 8.

10 **Préparation de la polylysine histidylée substituée par la biotine**

La polylysine substituée par 60 résidus histidyles (15 mg ; 0,28 μ mol) dissoute dans 1 ml de DMSO en présence de DIEA (4 μ l ; 28 μ mol) est mise à réagir pendant 7 h à 20°C avec l'ester N-hydroxysuccinimide du
15 6-(biotinamido)hexanoate (NHS-LC-biotine, Pierce, USA). Le polymère est précipité par addition de 10 volumes d'isopropanol. Le précipité est récupéré après centrifugation (1 800 g, 15 min) et lavé dans l'isopropanol puis dissous dans l'eau et lyophilisé.

20

REVENDICATIONS

1. Complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et
5 au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide
nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué
polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des
fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées
10 dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ
45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance
magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide
entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes
cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose, et/ou des
15 endosomes,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

. ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au
susdit polymère,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu
20 par un récepteur membranaire cellulaire,

. ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être
également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des
charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué,
25 facilitant le relargage de l'acide nucléique au cours de la dissociation du
complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés
suivantes:

. ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance
30 reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un
récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

. soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des
35 susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),

. soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une
diminution de charge (par exemple gluconoylé), notamment par les
groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés,

. soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),

. soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

2. Complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose et/ou des endosomes,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

. ce sont des bases dont le pK en milieu aqueux est inférieur à 8, de sorte qu'une proportion supérieure à 50% de ces bases liée à un polymère cationique ne soit pas protonée en milieu neutre de pH 7,4,

. ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

. ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique au cours de la dissociation du complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes:

. ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

5 . soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),

10 . soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl), et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge,

. soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),

15 . soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

20 3. Complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

25 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes
30 cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

. ils appartiennent à la famille des composés comportant un noyau imidazole,

. ils appartiennent à la famille des quinolines,

35 . ils appartiennent à la famille des ptérines,

. ils appartiennent à la famille des pyridines,

. les susdits résidus comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

- . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,
- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

5 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, et/ou par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique au cours de la dissociation du complexe, sous réserve que l'ensemble
10 des susdits résidus contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres,

 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par au moins une molécule constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, et/ou par des
15 résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

 - les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes:

- . ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu
20 par un récepteur membranaire cellulaire,

 - des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

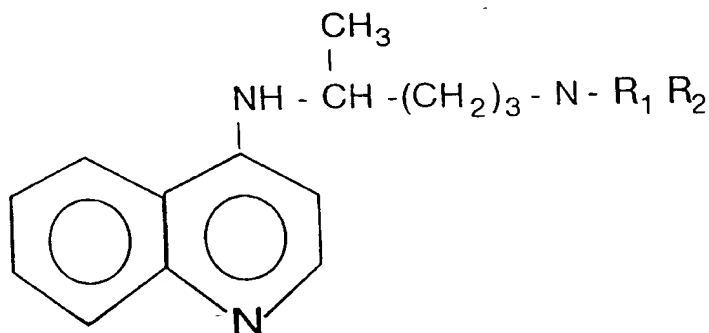
- . soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des
25 susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),
- . soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl) et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge,
- . soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation
30 des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),
- . soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

35 sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

4. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel les résidus entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires sont

- des alkylimidazoles dans lequel le radical alkyle comporte de 1 à 10, notamment de 2 à 6 atomes de carbone, et dans lequel un seul des atomes d'azote du noyau imidazole est substitué,

- ou des quinolines de formule :



dans laquelle R_1 représente H et R_2 représente $(CH_2)_n-CO_2-H$, n étant un nombre entier variant de 1 à 10, et de préférence valant de 1 à 3.

5. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel les résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires sont choisis parmi : histidine, 4-carboxyméthyl-imidazole, 3-(1-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 3-(3-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 2-carboxy-imidazole, histamine, acide 3-(imidazol-4yl)-L-lactique, 2-(1-méthyl-imidazol-4yl)éthylamine, 2-(3-méthyl-imidazol-4yl)éthylamine, β -alanyl-histidine-(carnosine), 7-chloro-4(amino-1-méthylbutylamino)-quinoline, N^4 -(7-chloro-4-quinoliny)-1,4-pentanediamine, 8-(4-amino-1-méthylbutylamino)-6-méthoxy-quinoline (primaquine), N^4 -(6-méthoxy-8-quinoliny)-1,4-pentanediamine, acide quininique, acide quinoline carboxylique, acide ptéroïque, acide nicotinique, acide quinolinique, et dans lequel

- la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus (par exemple histidine) peut être également substituée par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

5 6. Complexe selon l'une des revendications 1 à 5, entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des
10 résidus de lysine ou d'ornithine, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, par des résidus entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires,

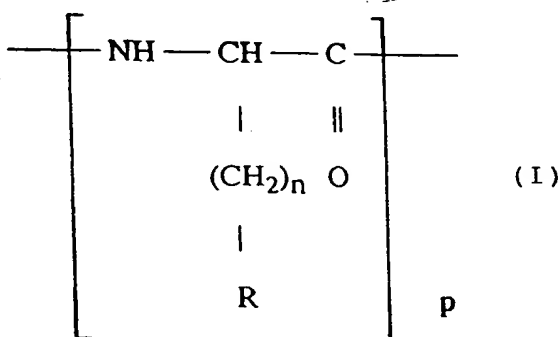
15 - les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ils comportent un noyau imidazole,
- . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,
- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance,

- les fonctions NH_3^+ libres restantes des susdits motifs monomères étant
20 également substituées à raison d'environ 1% à environ 60% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant une masse moléculaire inférieure à 5000, ce signal de reconnaissance pouvant être présent à raison d'une molécule pour environ 200 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules
25 pour environ 200 motifs du conjugué polymérique,

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

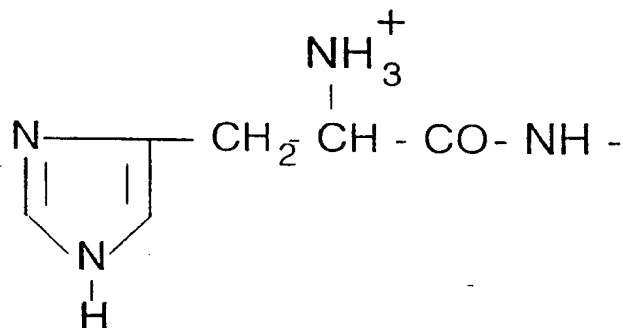
30 7. Complexe selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel le polymère contient un groupement polymérique de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- p est un nombre entier variant de 15 à 900, de préférence de 100 à 300,
- n est un nombre entier variant de 1 à 6, et vaut de préférence 4,
- ce groupement polymérique contient des radicaux R parmi lesquels :

10 . 10% à 45% du nombre de radicaux R représentant un résidu comportant un noyau imidazole et éventuellement une fonction NH_3^+ libre, notamment un résidu histidyle, R pouvant être représenté par la formule :



la fonction NH_3^+ éventuelle des susdits résidus pouvant être également substituée par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance,

20 . 10% à 90% du nombre de radicaux R, représentant les ω -amino NH_3^+ libres, et étant éventuellement substitué à raison de 0 à 50% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, notamment à raison de 0 à 60, avantageusement de 1 molécule pour environ 200 motifs, ou à raison de 2 à 100, avantageusement de 50 molécules pour environ 200 motifs, et/ou

25 . R pouvant en outre être constitué de 0 à 45% par un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, notamment un reste dihydroxypropionoylamido, érythronoylamido, thréonoylamido, ribonoylamido, arabinoylamido, xylonoylamido, lyxonoylamido, gluconoylamido, galactonoylamido, mannonoylamido, glycoheptonoylamido, glycooctonoylamido, m est un nombre entier de 2 à 15, de préférence de 2 à 7, R_1 représente H ou un radical alcoyle de 1 à 15 atomes de carbone, notamment CH_3 , ces radicaux pouvant être substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

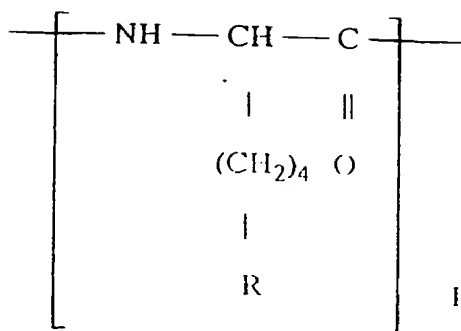
30

35

8. Complexe selon la revendication 4, dans lequel le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II) suivante :

5

10



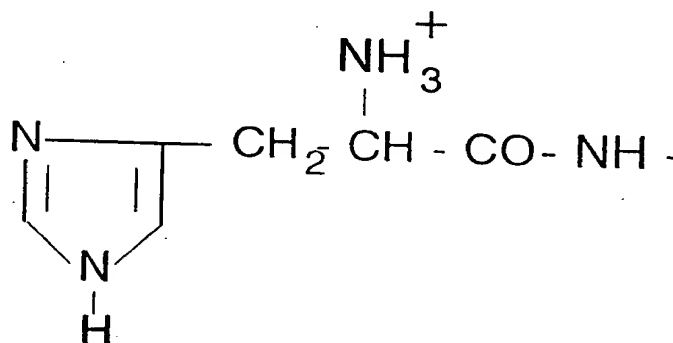
dans laquelle :

15

- p a les significations indiquées dans la revendication 4,
- 10% à 45% du nombre de radicaux R représentent un résidu comportant un noyau imidazole et éventuellement une fonction NH_3^+ libre, notamment un résidu histidyle, R pouvant être représenté par la formule

20

25



les fonctions NH_3^+ des susdits résidus pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance,

30

- le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre de radicaux R, représentant les ω -amino NH_3^+ , et de 0% à 45% des radicaux R pouvant être substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

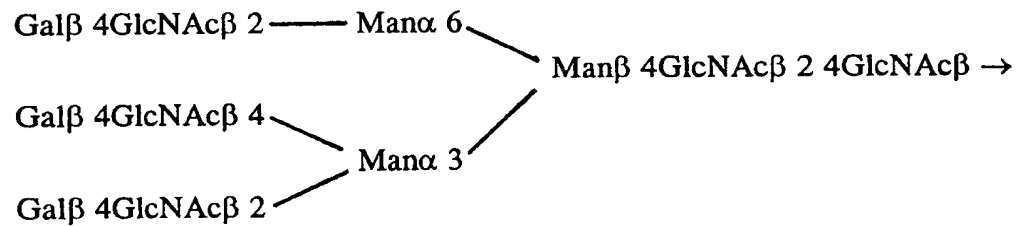
35

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre de motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

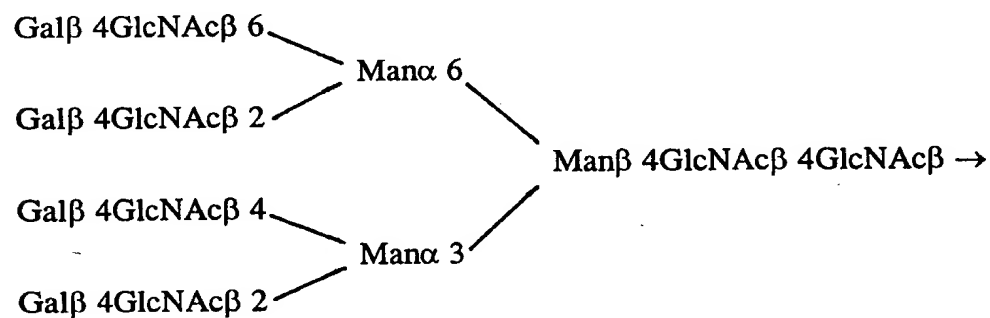
9. Complexe selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le signal de reconnaissance est choisi parmi:

A) - des osides simples ou complexes reconnus par des lectines membranaires, et choisis parmi:

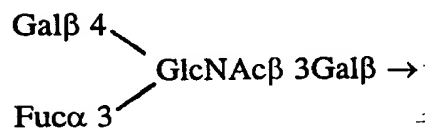
a. Asialo-oligoside de type triantennaire lactosamine: récepteur d'asialoglycoprotéine



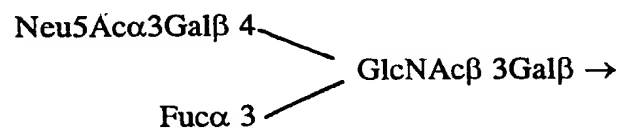
b. Asialo oligoside de type lactosamine tetraantennaire: récepteur d'asialoglycoprotéine



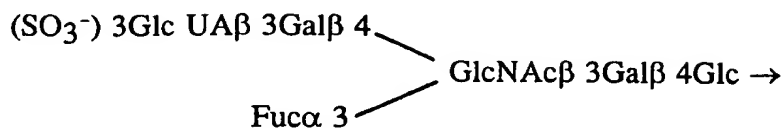
c. Lewis x: LECAM 2/3



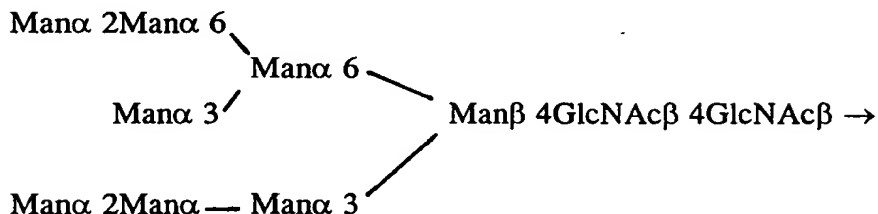
d. Lewis x sialyl: LECAM 3/2



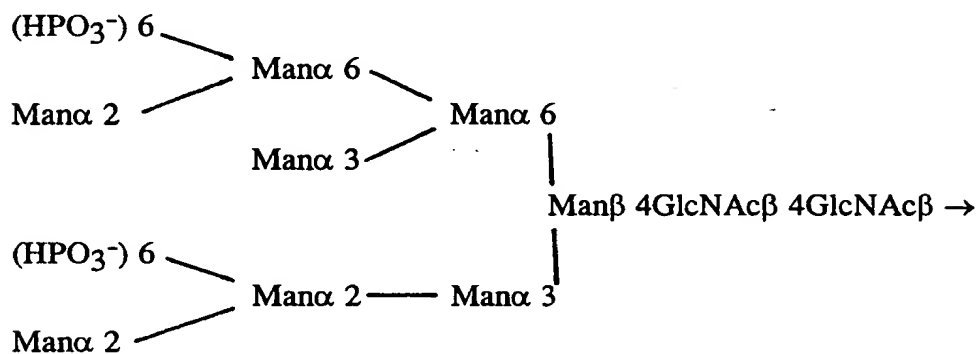
e. Dérivé de Lewis x sulfaté (HNK1): LECAM 1



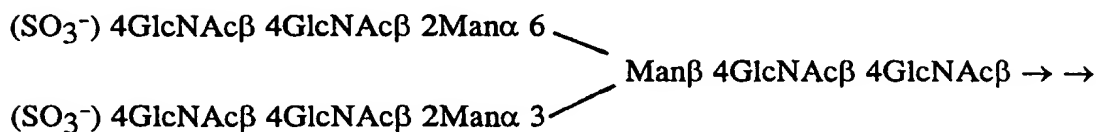
f. Oligomannoside: récepteur du mannose



g. Oligomannoside phosphorylé: récepteur de mannose 6 phosphate



h. Oligosaccharide de type lactosamine sulfaté: récepteur de GalNAc 4 sulfaté



B) des peptides

a) peptides anti-inflammatoires ou certains de leurs fragments reconnus par des récepteurs de la paroi vasculaire, tels que

- polypeptide vasodilatateur intestinal (VIP)

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH₂

- polypeptide atrial natriurétique (ANP)

SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY

- lipocortine

HDMNKVLDL

- bradykinine

RPPGFSPFR;

b) peptides ligands des intégrines, tels que les peptides contenant la séquence RGD, ligand de la fibronectine;

c) facteurs chimiotactiques, tels que les formyl peptides et leurs antagonistes: FMLP, (N-formyl-Met-Leu-Phé);

d) hormones peptidiques tels que

l' α -MSH: Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH₂ et leurs antagonistes,

C) Métabolites naturels tels que:

- la biotine,

- la carnitine.

- le tétrahydrofolate et l'acide folique pouvant être à la fois un signal de reconnaissance vis-à-vis de certaines cellules possédant les récepteurs appropriés et un déstabilisateur des membranes cellulaires.

10. Complexe selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'acide nucléique peut être choisi parmi:

a) des gènes marqueurs, tels que

- gènes contenant la luciférase,

- protéine verte de la méduse *Aequorea victoria*,

- gènes contenant la β -galactosidase,

- gènes contenant la chloramphénicol acétyl transférase,

- gènes conférant la résistance à un antibiotique, tels que l'hygromycine, la néomycine etc...;

b) des gènes à visée thérapeutique, tels que

- récepteurs des lipoprotéines de faible densité, déficient dans les cas d'hypercholestérolémie,

- facteurs de coagulation: facteurs VIII et IX,

- phénylalanine-hydroxylase (phénylcétonurie),

- adénosine désaminase (immunodéficiencia ADA),

- enzymes lysosomiques, telles que la β -glucosidase dans le cas de la maladie de Gaucher,

- dystrophine et minidistrophine (myopathie),

- tyrosine hydroxylase (Parkinson),

- facteurs de croissance des neurones (Alzheimer),
- CFTR cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator (mucoviscidose),
- alpha1-antitrypsine,
- cytokines (interleukines, TNF facteur de nécrose des tumeurs),
- thymidine kinase du virus Herpes simplex,
- protéines du MHC, système majeur d'histocompatibilité, en particulier les HLA-B7,
- cytosine désaminase,
- gènes codant pour des ARN sens et antisens,
- gènes codant pour des ribozymes,
- c) des gènes à visée vaccinale
 - gènes codant pour des antigènes viraux (vaccination), par exemple: gène codant pour la nucléoprotéine du virus de la grippe.

11. Complexe selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel:

- le polymère, notamment la polylysine présente un degré de polymérisation d'environ 15 à environ 900, de préférence 200,
- les fonctions NH_3^+ libres des motifs lysine étant substituées dans un rapport de 35% par des résidus histidyle et éventuellement par une molécule constituant un signal de reconnaissance pour 1 à 50 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité d'au moins 10^5 l mole^{-1} vis-à-vis du récepteur de la cellule que le complexe doit cibler ou éventuellement par 20 à 100 molécules de signal de reconnaissance pour 200 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité inférieure à 10^5 l mole^{-1} vis à vis du susdit récepteur,
- l'acide nucléique présente une masse moléculaire d'environ 10^6 à environ 10^8 , et notamment de $3 \cdot 10^6$ à $30 \cdot 10^6$,
- le rapport entre le nombre moyen de paires de base de l'acide nucléique par molécule de motif de monomère, notamment la lysine est d'environ 0,2 à environ 6, de préférence d'environ 0,4 à environ 0,6.

12. Conjugué polymérique chargé positivement, contenant des motifs portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus entraînant en milieu faiblement acide une

déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

. ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

. ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes:

. ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

. les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés pouvant être substitués par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

. soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ des lysines),

. soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl), et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés, entraînant une diminution de charge,

. soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),

. soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

13. Conjugué polymérique selon la revendication 12, et tel que défini selon l'une des revendications 2 ou 3, ou contenant un groupement polymérique de formule selon l'une des revendications 4 ou 5.

5 14. Utilisation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 11, ou d'un conjugué selon l'une des revendications 12 ou 13, pour la transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* de cellules à l'aide d'un gène, notamment ceux définis à la revendication 6.

10 15. Utilisation d'un complexe ou d'un conjugué selon la revendication 11, caractérisé en ce que les cellules sont choisies parmi:

- des cellules souches hématopoïétiques;
- des cellules dendritiques,
- cellules du foie;
- 15 - cellules des muscles squelettiques;
- cellules de la peau:
 - . fibroblastes,
 - . kératinocytes,
 - . cellules dendritiques,
 - 20 . mélanocytes.
- cellules des parois vasculaires;
 - . endothéliales;
 - . musculaires lisses;
- cellules épithéliales des voies aériennes;
- 25 - cellules du système nerveux central;
- cellules cancéreuses;
- cellules du système immunitaire, telles que des lymphocytes, des macrophages, des cellules NK etc...

30 16. Méthode de transfection *in vitro* ou *ex vivo*, caractérisée en ce que l'on met en présence un complexe, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans un milieu contenant des cellules à transfecter, dans des conditions telles qu'il y a:

- passage du complexe à partir du milieu dans le cytoplasme des
- 35 cellules,
- relargage de l'acide nucléique impliqué dans le susdit complexe dans le cytosol et/ou le noyau des cellules,

- transcription et expression de l'acide nucléique dans les cellules transfectées

- expression de la protéine correspondant au gène transfecté.

5 17. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de substance active, l'un au moins des complexes selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, ou l'un au moins des conjugués selon l'une des revendications 12 ou 13, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10 18. Utilisation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 11, ou d'un conjugué selon l'une des revendications 12 ou 13, pour la préparation d'un médicament destiné par exemple au traitement de déficience métabolique congénitale ou acquise, ou au traitement de tumeurs, ou pour la préparation d'un

15 vaccin, par exemple vaccin contre la grippe.

 19. Trousse ou kit comprenant:

 - un conjugué polymérique selon l'une des revendications 12 ou 13, tel que la polylysine, substituée par un résidu entraînant en milieu faiblement acide une

20 déstabilisation des membranes cellulaires, ce conjugué polymérique étant apte à comporter éventuellement un signal de reconnaissance, lequel est préalablement fixé ou non sur le susdit conjugué polymérique, ledit signal de reconnaissance étant fonction de la cellule à cibler,

 - éventuellement un plasmide contenant au moins un gène à transférer, et éventuellement le système de régulation de l'expression du susdit gène,

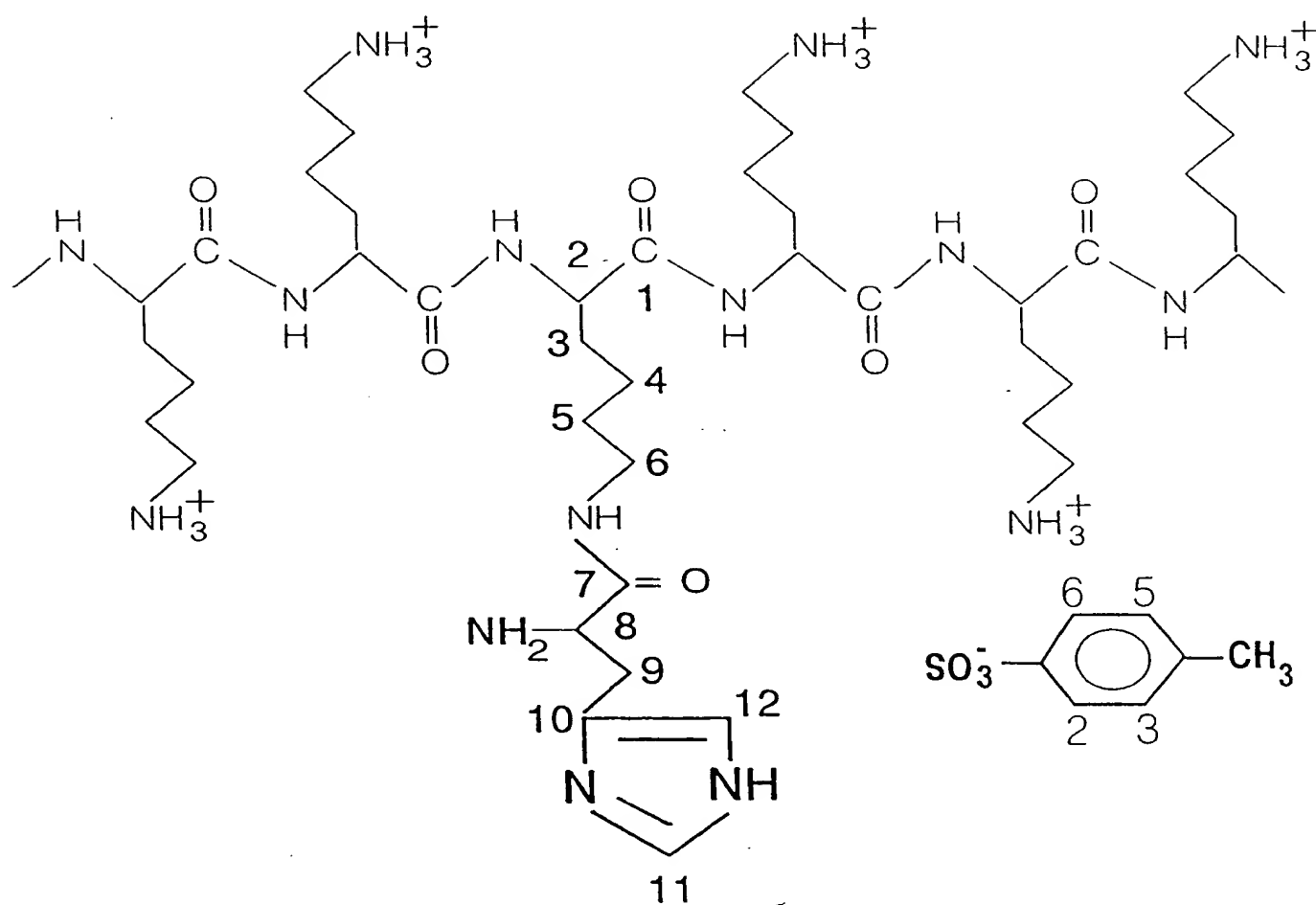
25

 - des réactifs permettant la fixation éventuelle du signal de reconnaissance sur le susdit conjugué polymérique,

 - des réactifs permettant la formation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 11, ou entre le conjugué polymérique et le gène à transférer, ou entre le conjugué polymérique et un plasmide contenant le gène à transférer,

30

 - des réactifs permettant la transfection de la cellule par le susdit complexe.



HispLK

Figure 1

This Page Blank (uspto)

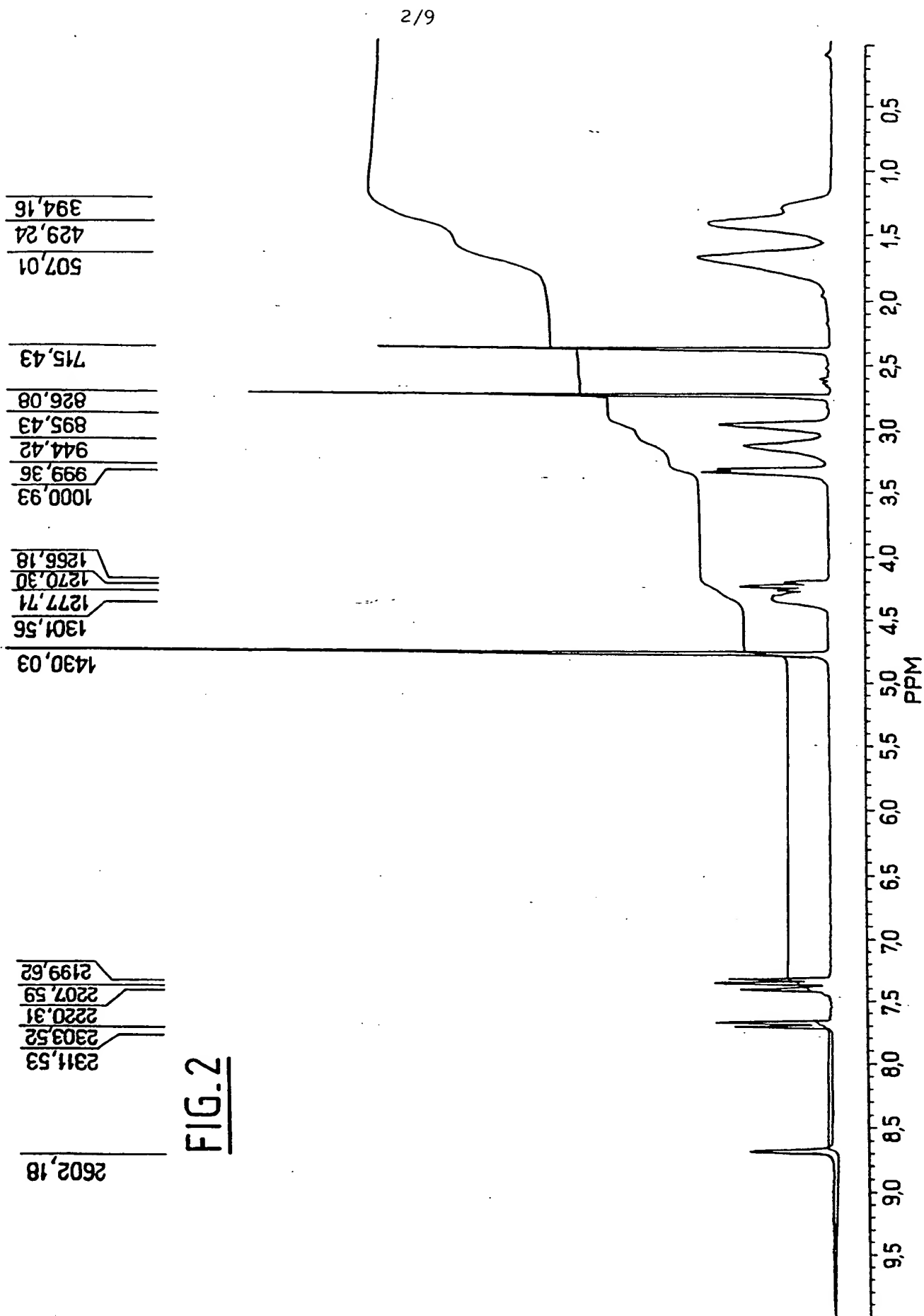


FIG. 2

This Page Blank (uspto)

3/9

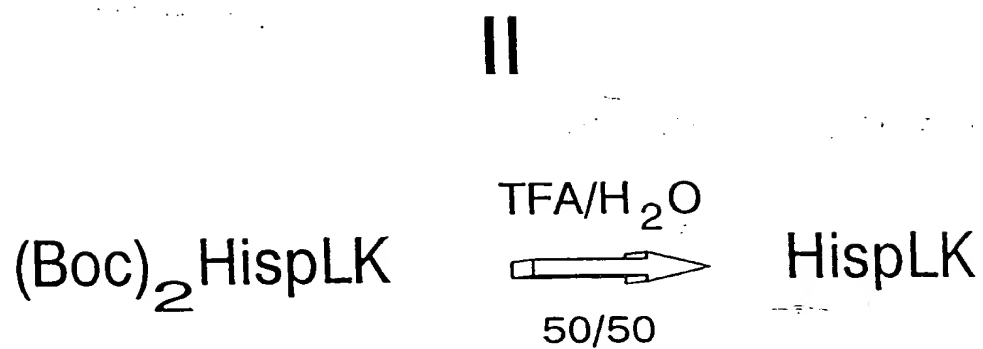
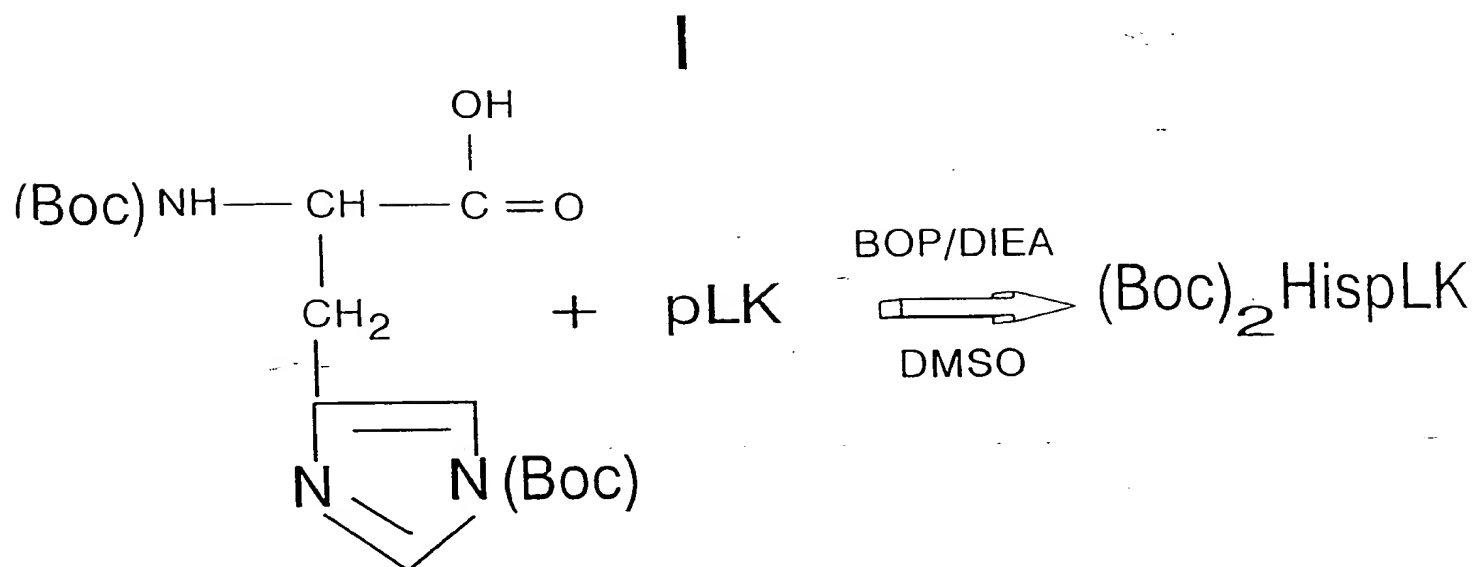


Figure 3

This Page Blank (uspto)

4/9

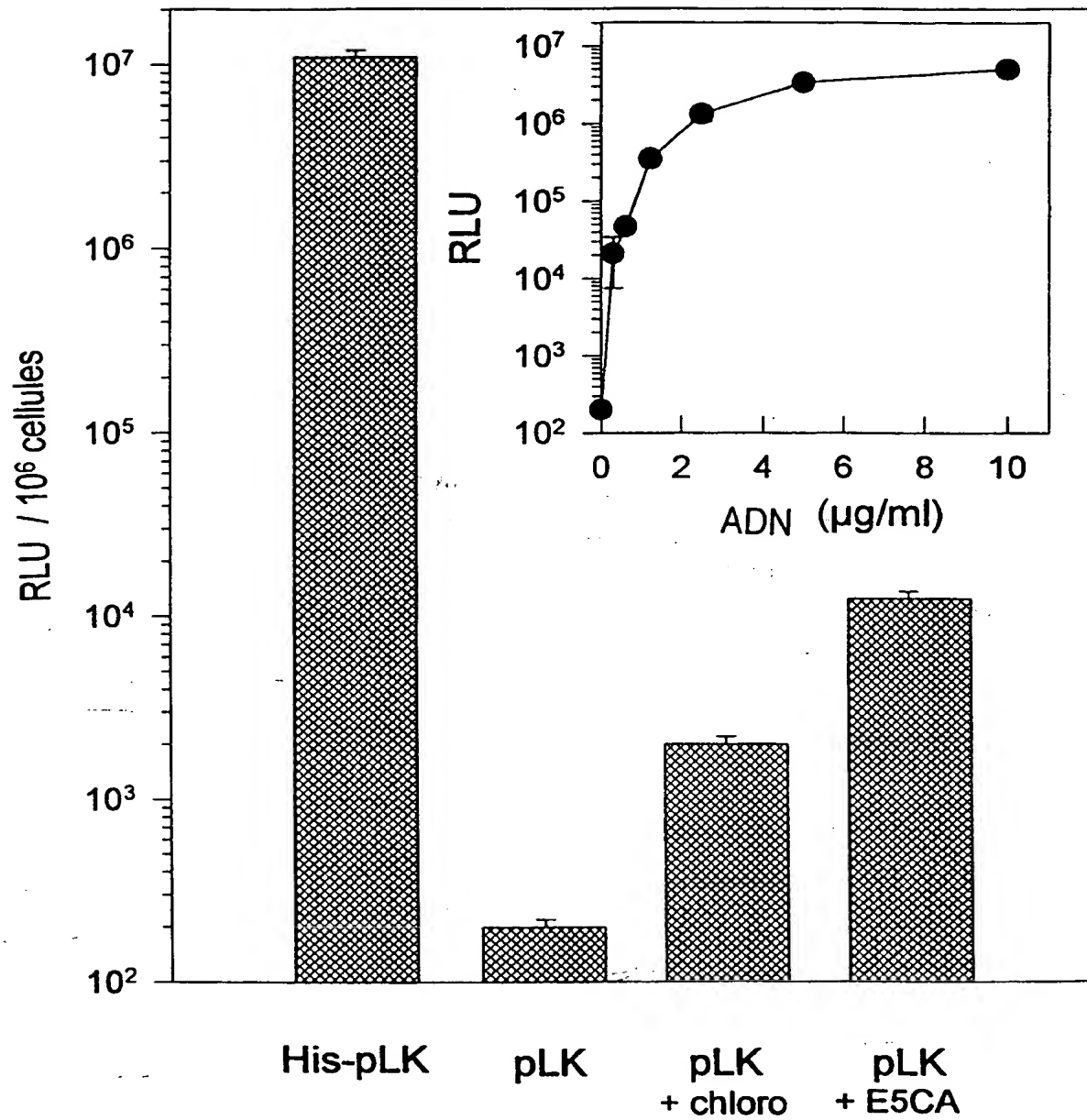


Figure 4

This Page Blank (uspto)

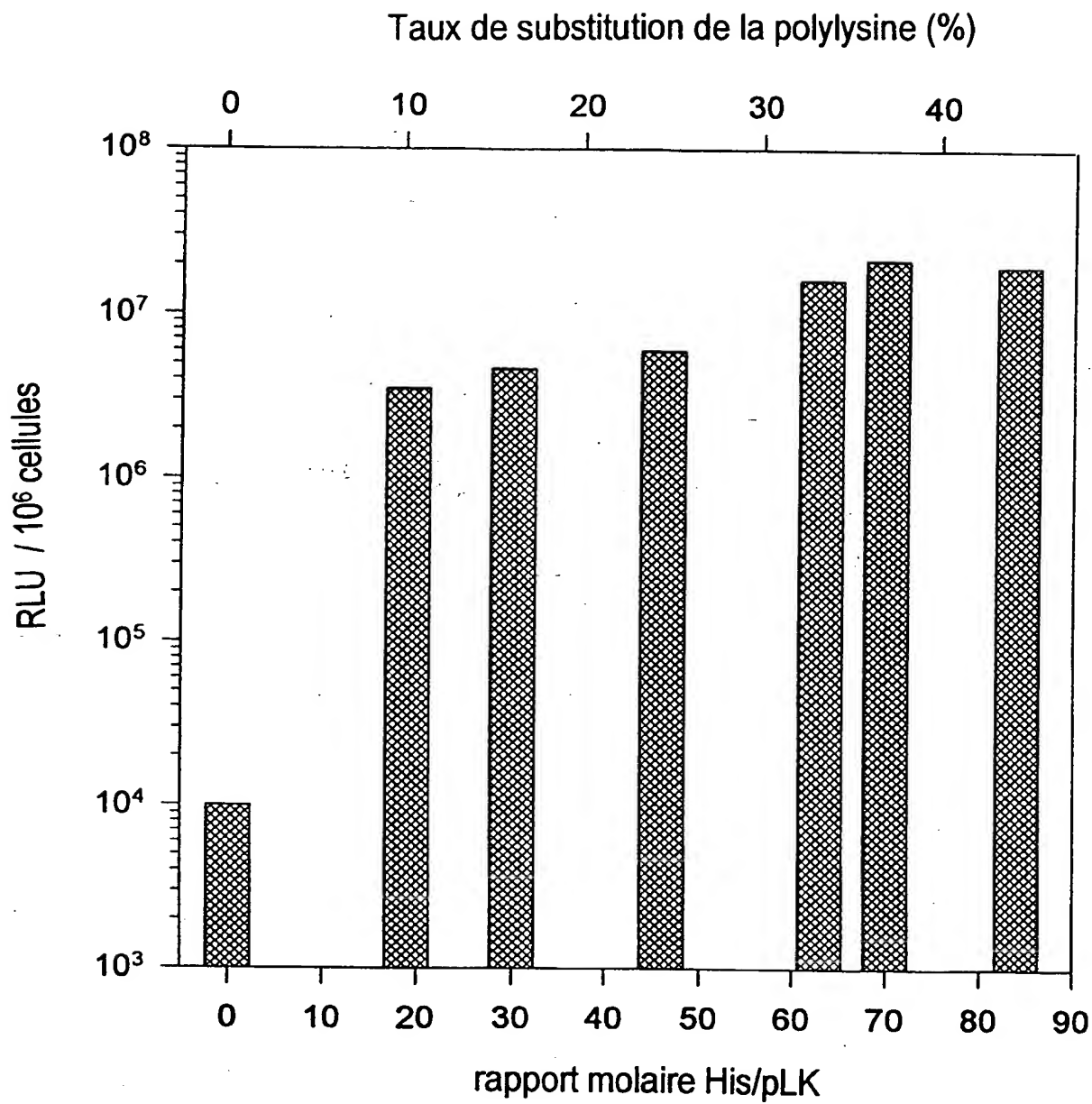


Figure 5

This Page blank (uspto)

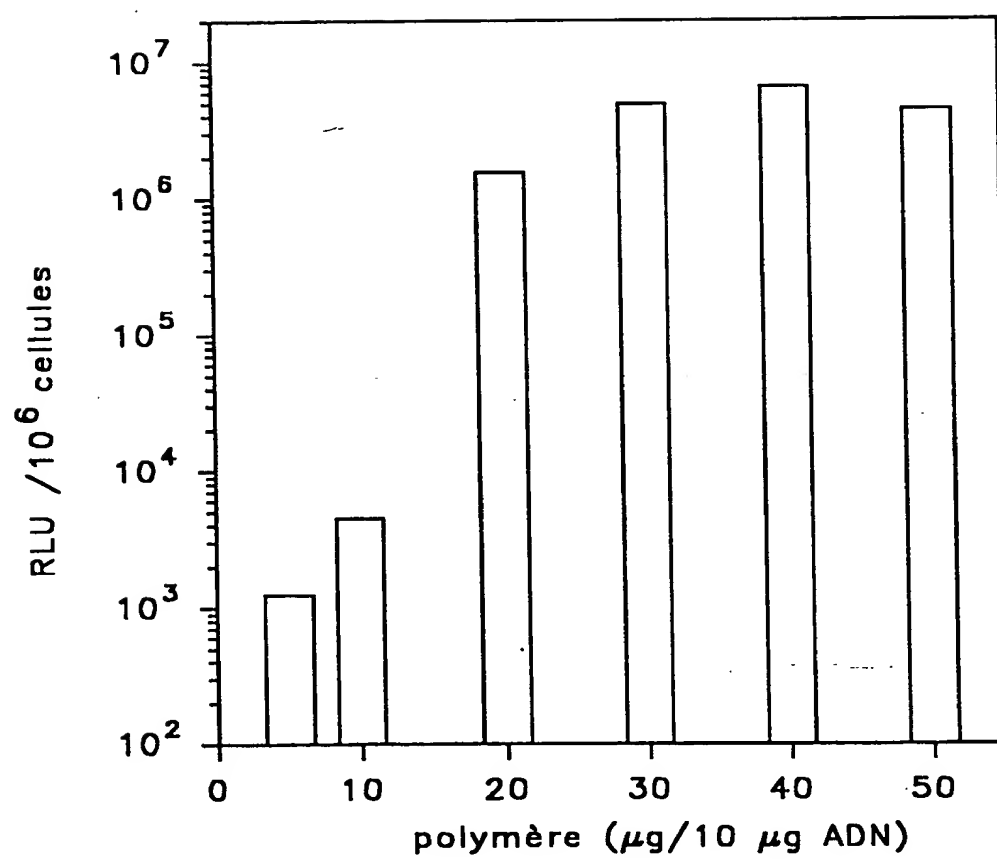


Figure 6

This Page Blank (uspto)

7/9

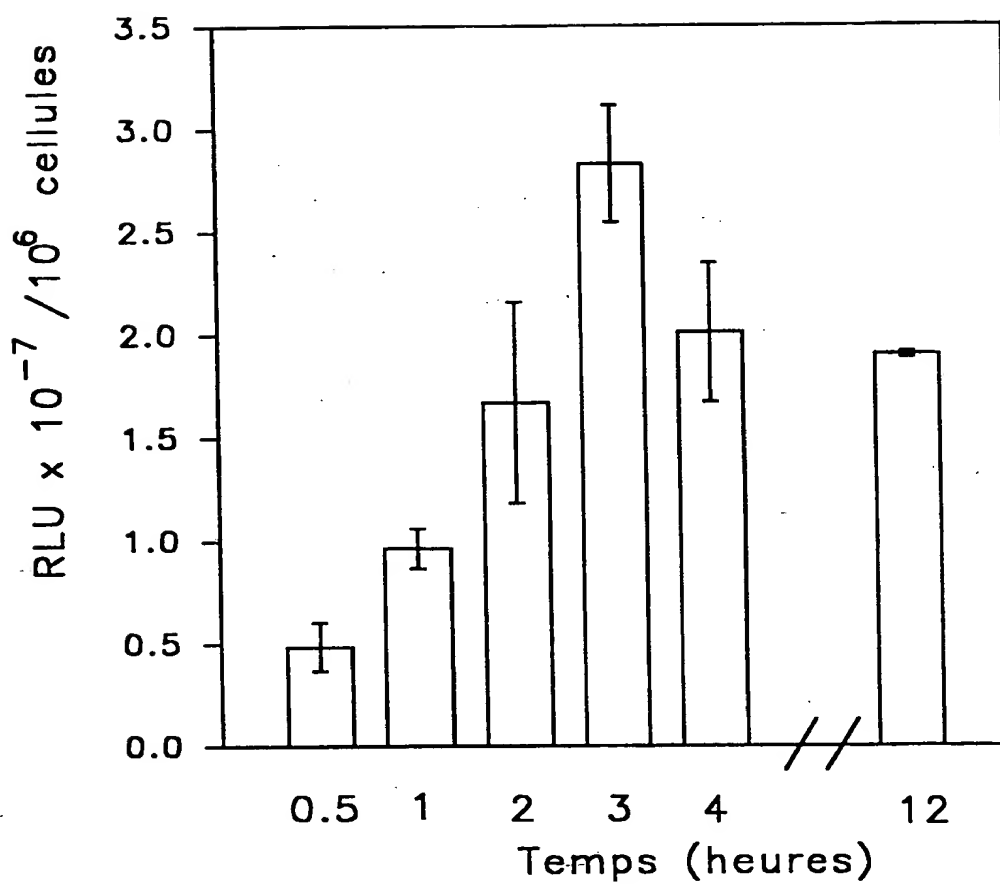


Figure 7

This Page Blank (uspto)

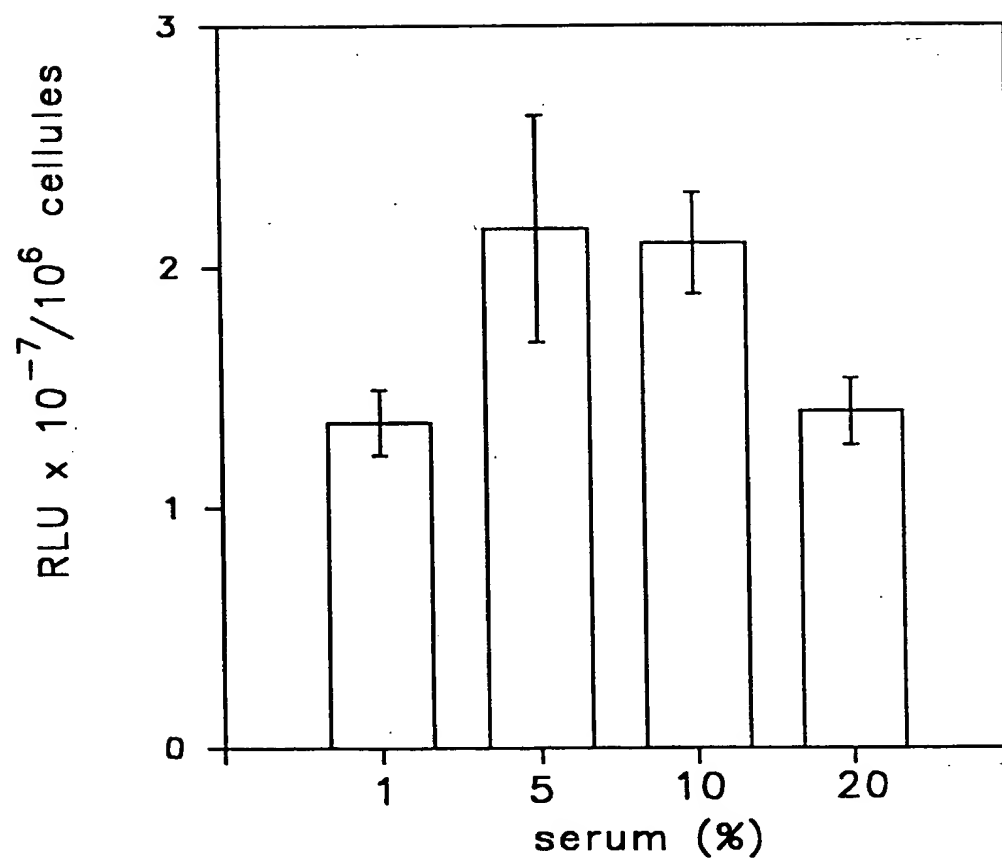


Figure 8

This Page Blank (uspto)

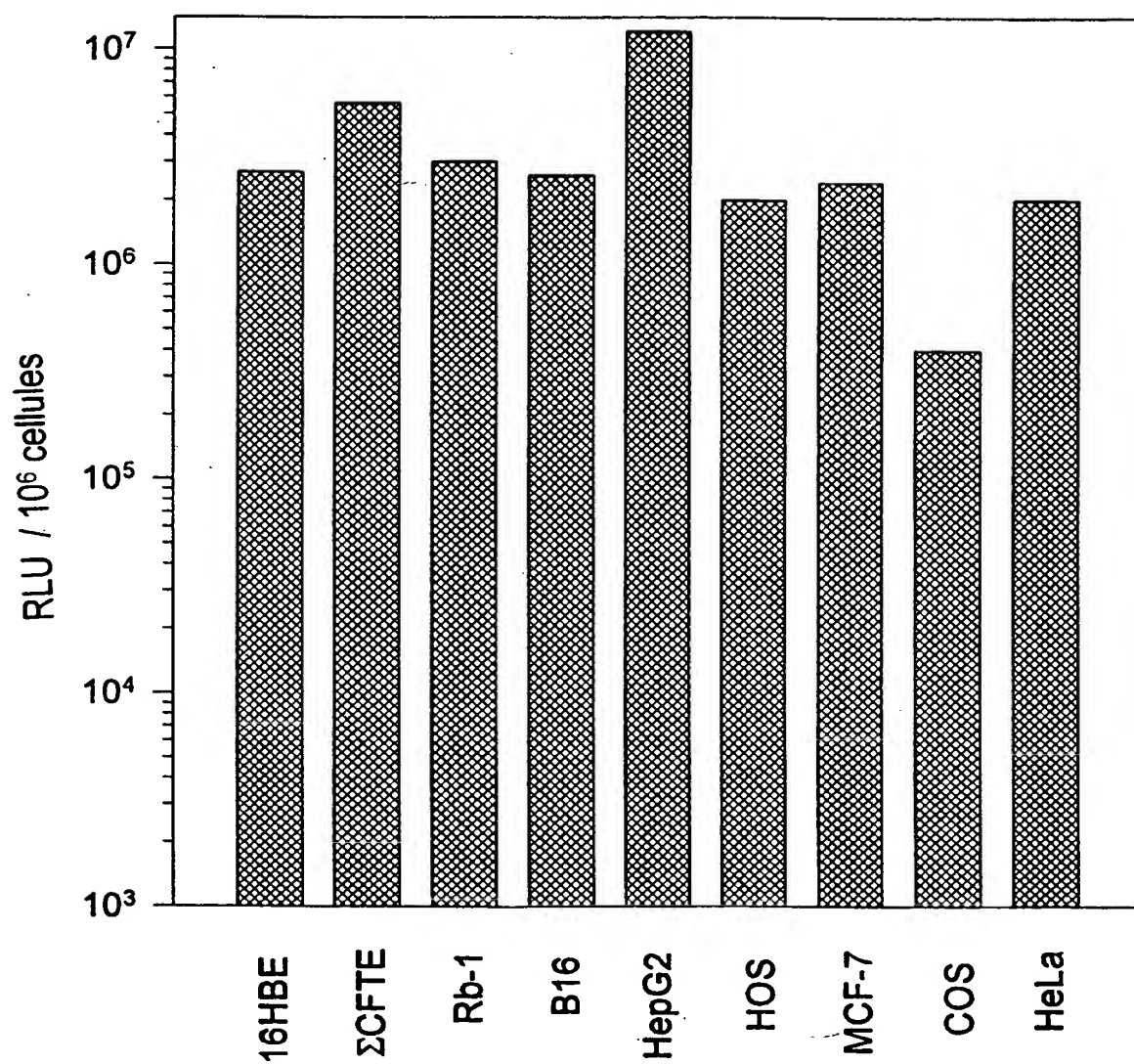


Figure 9

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/02022

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WANG C. Y. ET AL: "POLYHISTIDINE MEDIATES AN ACID-DEPENDENT FUSION OF NEGATIVELY CHARGED LIPOSOMES" BIOCHEMISTRY, vol. 23, no. 19, 1984, pages 4409-4416, XP002016041 cited in the application see page 4410, column 1, paragraph 2 see page 4413, column 1, paragraph 2 - page 4415, column 2, paragraph 1</p>	1-8
A	<p>MIDOUX P ET AL: "SPECIFIC GENE TRANSFER MEDIATED BY LACTOSYLATED POLY-L-LYSINE INTO HEPATOMA CELLS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, no. 4, 25 February 1993, pages 871-878, XP000371764 cited in the application see the whole document</p>	1,9,10,12
Y		7
A	<p>WO 92 13570 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT. INC.; GENENTECH INC (US)) 20 August 1992</p> <p>see abstract * examples * * claims *</p>	1,2,4,10,12,14,15,18
A	<p>EP 0 387 775 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL INC.) 19 September 1990 see example 6</p>	10,14-16
A	<p>EP 0 388 758 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL INC.) 26 September 1990 see abstract see page 2, line 37 - page 5, line 17</p>	1,5,9,10,15,16
A	<p>US 5 166 320 A (WU GEORGE Y. ET AL) 24 November 1992 see the whole document</p>	1,3,4,9-11
A	<p>WO 92 11037 A (ADVANCED MAGNETICS INC) 9 July 1992</p>	2,3,9-15
A	<p>FR 2 107 756 A (HOFFMANN-LA ROCHE & CIE SOCIETE ANONYME) 5 May 1972</p>	6,7,11
A	<p>EP 0 350 246 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 10 January 1990</p>	16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/02022

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/88 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FR 2 719 316 A (IDM IMMUNO-DESIGNED MOLECULES) 3 November 1995 cited in the application	1-8
A	see the whole document	9,10,12, 14-19
X	--- MEZÖ G. ET AL.: "Carrier design: conformational studies of amino acid (X) and oligopeptide (X-DL-Ala-m) substituted poly(L-lysine)." BIOPOLYMERS, vol. 33, no. 6, 1993, pages 873-885, XP002034603 see the whole document --- -/-	12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 April 1998

Date of mailing of the international search report

16.04.98

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/02022

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2719316 A	03-11-95	AU 2412895 A CA 2187629 A EP 0753070 A WO 9530020 A US 5595897 A	29-11-95 09-11-95 15-01-97 09-11-95 21-01-97
WO 9213570 A	20-08-92	DE 4104186 A AT 142890 T DE 59207189 D EP 0571414 A ES 2094342 T JP 6504993 T	13-08-92 15-10-96 24-10-96 01-12-93 16-01-97 09-06-94
EP 0387775 A	19-09-90	AT 140961 T AU 637354 B AU 5130190 A CA 2012312 A DE 59010432 D ES 2090049 T HU 9500692 A IE 74850 B IL 93754 A JP 3130080 A NZ 232917 A PT 93440 A	15-08-96 27-05-93 01-11-90 16-09-90 05-09-96 16-10-96 28-12-95 13-08-97 31-12-95 03-06-91 27-07-97 07-11-90
EP 0388758 A	26-09-90	AU 637085 B AU 5137290 A CA 2012311 A HU 9500693 A IL 93755 A JP 3200800 A NO 301932 B NZ 232918 A PT 93441 A,B. RU 2098487 C US 5354844 A	20-05-93 20-09-90 16-09-90 29-01-96 31-12-95 02-09-91 29-12-97 27-07-97 07-11-90 10-12-97 11-10-94
US 5166320 A	24-11-92	US 5635383 A JP 63269985 A	03-06-97 08-11-88

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/02022

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9211037 A	09-07-92	AT 151991 T	15-05-97
		CA 2097589 A	20-06-92
		DE 69125848 D	28-05-97
		DE 69125848 T	31-07-97
		DE 563249 T	03-03-94
		EP 0563249 A	06-10-93
		ES 2059299 T	16-11-94
		JP 6503347 T	14-04-94
		US 5490991 A	13-02-96
		US 5554386 A	10-09-96
		US 5589591 A	31-12-96
		US 5478576 A	26-12-95
		US 5336506 A	09-08-94
FR 2107756 A	05-05-72	BE 772660 A	16-03-72
		DE 2146155 A	23-03-72
		GB 1316990 A	16-05-73
		NL 7112808 A	21-03-72
		US 3759890 A	18-09-73
EP 0350246 A	10-01-90	CA 1339300 A	19-08-97
		DE 68907139 T	02-12-93
		ES 2055067 T	16-08-94
		HU 9500499 A	30-10-95
		JP 2124814 A	14-05-90
		US 5271945 A	21-12-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 97/02022

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/88 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FR 2 719 316 A (IDM IMMUNO-DESIGNED MOLECULES) 3 novembre 1995 cité dans la demande	1-8
A	voir le document en entier	9, 10, 12, 14-19
X	--- MEZÖ G. ET AL.: "Carrier design: conformational studies of amino acid (X) and oligopeptide (X-DL-Ala-m) substituted poly(L-lysine)." BIOPOLYMERS, vol. 33, no. 6, 1993, pages 873-885, XP002034603 voir le document en entier --- -/-	12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 avril 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16.04.98

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 97/02022

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>WANG C. Y. ET AL: "POLYHISTIDINE MEDIATES AN ACID-DEPENDENT FUSION OF NEGATIVELY CHARGED LIPOSOMES"</p> <p>BIOCHEMISTRY,</p> <p>vol. 23, no. 19, 1984,</p> <p>pages 4409-4416, XP002016041</p> <p>cité dans la demande</p> <p>voir page 4410, colonne 1, alinéa 2</p> <p>voir page 4413, colonne 1, alinéa 2 - page 4415, colonne 2, alinéa 1</p> <p>---</p>	1-8
A	<p>MIDOUX P ET AL: "SPECIFIC GENE TRANSFER MEDIATED BY LACTOSYLATED POLY-L-LYSINE INTO HEPATOMA CELLS"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH,</p> <p>vol. 21, no. 4, 25 février 1993,</p> <p>pages 871-878, XP000371764</p> <p>cité dans la demande</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	1,9,10, 12
Y		7
A	<p>WO 92 13570 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT. INC.; GENENTECH INC (US)) 20 août 1992</p> <p>voir abrégé</p> <p>* exemples *</p> <p>* revendications *</p> <p>---</p>	1,2,4, 10,12, 14,15,18
A	<p>EP 0 387 775 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL INC.) 19 septembre 1990</p> <p>voir exemple 6</p> <p>---</p>	10,14-16
A	<p>EP 0 388 758 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL INC.) 26 septembre 1990</p> <p>voir abrégé</p> <p>voir page 2, ligne 37 - page 5, ligne 17</p> <p>---</p>	1,5,9, 10,15,16
A	<p>US 5 166 320 A (WU GEORGE Y. ET AL) 24 novembre 1992</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	1,3,4, 9-11
A	<p>WO 92 11037 A (ADVANCED MAGNETICS INC) 9 juillet 1992</p> <p>---</p>	2,3,9-15
A	<p>FR 2 107 756 A (HOFFMANN-LA ROCHE & CIE SOCIETE ANONYME) 5 mai 1972</p> <p>---</p>	6,7,11
A	<p>EP 0 350 246 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 10 janvier 1990</p> <p>-----</p>	16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 97/02022

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2719316 A	03-11-95	AU 2412895 A	29-11-95
		CA 2187629 A	09-11-95
		EP 0753070 A	15-01-97
		WO 9530020 A	09-11-95
		US 5595897 A	21-01-97

WO 9213570 A	20-08-92	DE 4104186 A	13-08-92
		AT 142890 T	15-10-96
		DE 59207189 D	24-10-96
		EP 0571414 A	01-12-93
		ES 2094342 T	16-01-97
		JP 6504993 T	09-06-94

EP 0387775 A	19-09-90	AT 140961 T	15-08-96
		AU 637354 B	27-05-93
		AU 5130190 A	01-11-90
		CA 2012312 A	16-09-90
		DE 59010432 D	05-09-96
		ES 2090049 T	16-10-96
		HU 9500692 A	28-12-95
		IE 74850 B	13-08-97
		IL 93754 A	31-12-95
		JP 3130080 A	03-06-91
		NZ 232917 A	27-07-97
		PT 93440 A	07-11-90

EP 0388758 A	26-09-90	AU 637085 B	20-05-93
		AU 5137290 A	20-09-90
		CA 2012311 A	16-09-90
		HU 9500693 A	29-01-96
		IL 93755 A	31-12-95
		JP 3200800 A	02-09-91
		NO 301932 B	29-12-97
		NZ 232918 A	27-07-97
		PT 93441 A,B	07-11-90
		RU 2098487 C	10-12-97
		US 5354844 A	11-10-94

US 5166320 A	24-11-92	US 5635383 A	03-06-97
		JP 63269985 A	08-11-88

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 97/02022

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9211037 A	09-07-92	AT 151991 T	15-05-97
		CA 2097589 A	20-06-92
		DE 69125848 D	28-05-97
		DE 69125848 T	31-07-97
		DE 563249 T	03-03-94
		EP 0563249 A	06-10-93
		ES 2059299 T	16-11-94
		JP 6503347 T	14-04-94
		US 5490991 A	13-02-96
		US 5554386 A	10-09-96
		US 5589591 A	31-12-96
		US 5478576 A	26-12-95
		US 5336506 A	09-08-94
FR 2107756 A	05-05-72	BE 772660 A	16-03-72
		DE 2146155 A	23-03-72
		GB 1316990 A	16-05-73
		NL 7112808 A	21-03-72
		US 3759890 A	18-09-73
EP 0350246 A	10-01-90	CA 1339300 A	19-08-97
		DE 68907139 T	02-12-93
		ES 2055067 T	16-08-94
		HU 9500499 A	30-10-95
		JP 2124814 A	14-05-90
		US 5271945 A	21-12-93

15 BREVET D'INVENTION

PREMIÈRE ET UNIQUE
PUBLICATION

22 Date de dépôt 16 septembre 1971, à 15 h 49 mn.
Date de la décision de délivrance..... 10 avril 1972.
Publication de la délivrance B.O.P.I. — «Listes» n. 18 du 5-5-1972.

51 Classification internationale (Int. Cl.) C 07 d 49/00//C 07 g 7/00; C 08 j 1/00.

71 Déposant : F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE SOCIÉTÉ ANONYME, résidant en Suisse.

73 Titulaire : *Idem* 71

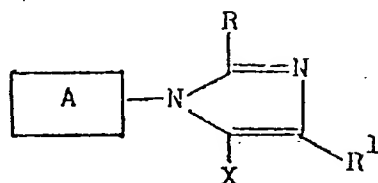
74 Mandataire : Cabinet Regimbeau, Corre, Paillet & Martin.

54 Dérivés d'imidazole.

72 Invention de : Donald Victor Wilson.

33 32 31 Priorité conventionnelle : *Demande de brevet déposée en Grande-Bretagne le 17 septembre 1970, n. 44.510/1970 au nom de Roche Products Limited.*

La présente invention a trait à de nouveaux dérivés d'imidazole. Plus particulièrement, elle a trait à des dérivés d'imidazole de la formule générale



I

5 dans laquelle A représente le radical d'un polypeptide, d'une protéine, d'un polysaccharide ou polymère aminé contenant au moins 1 groupe amino aliphatique primaire, R représente un atome d'hydrogène ou un groupe alcoyle, R¹ représente un atome d'hydrogène ou un groupe aminocarbonyle (qui peut être mono- ou disubstitué par de l'alcoyle) ou un groupe alcoxy-carbonyle, aralcoxy-carbonyle ou cyano, et X représente un groupe -NH₂ ou -N≡N⁺,
10

et à des couples de composés de la formule I dans laquelle X représente -N≡N⁺ avec une protéine, un phénol, une amine ou une
15 base hétérocyclique ou avec des membranes cellulaires.

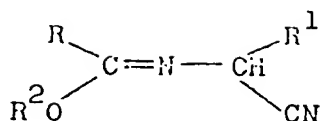
Selon la présente invention, les composés et couples sus-mentionnés sont préparés par un procédé caractérisé en ce qu'on traite un composé de la formule



II

dans laquelle A a la même signification que ci-dessus,

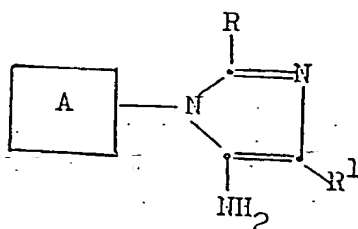
20 avec un composé imino de la formule générale



III

dans laquelle R et R¹ ont la même signification que ci-dessus et R² représente un groupe alcoyle,

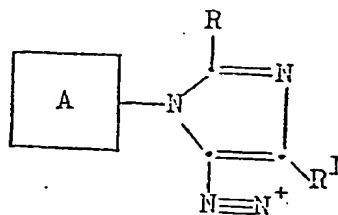
le cas échéant, en ce qu'on diazote le dérivé imidazolyle résultant de la formule générale



Ia

5 dans laquelle A, R et R¹ ont la même signification que ci-dessus,

de manière à obtenir le composé diazonium correspondant de la formule générale



Ib

10 dans laquelle A, R et R¹ ont la même signification que ci-dessus,

et, le cas échéant, en ce qu'on effectue la copulation dudit composé diazonium de la formule Ib avec une protéine, un phénol, une amine ou une base hétérocyclique ou avec des membranes cellulaires.

Les groupes alcoyle susmentionnés sont de préférence des groupes alcoyle inférieur, c'est-à-dire des groupes alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, tels que les groupes méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle et tert.-butyle. D'une manière
5 analogue, les groupes alcoxy-carbonyle sont de préférence des groupes alcoxy-carbonyle inférieur, c'est-à-dire des groupes alcoxy-carbonyle ne contenant pas plus de 4 atomes de carbone, tels que les groupes méthoxy-carbonyle et éthoxy-carbonyle.

Comme exemple de groupe aralcoxycarbonyle, on peut citer
10 le groupe benzyloxycarbonyle. R représente de préférence un groupe alcoyle, en particulier un groupe alcoyle inférieur et tout particulièrement le groupe méthyle, et R^1 représente un groupe amino-carbonyle. R^2 représente de préférence le groupe éthyle.

Une grande variété de substances de la formule II peut être
15 utilisée dans le présent procédé. Comme exemple de protéines pour la substance $A-NH_2$ de la formule II ci-dessus, on peut citer l'anticorps du lapin aux érythrocytes humains du groupe O. Comme autre exemple de substances $A-NH_2$, on peut citer l'albumine sérique d'origine bovine, l'ovalbumine, l'insuline, des polypep-
20 tides tels que la L ou la DL-polylysine, l'albumine sérique du lapin et les composantes protéiniques de l'extrait de pollen du timothe.

Le traitement d'une substance représentée par la formule II avec un composé imino de la formule III peut être effectué d'une
25 manière appropriée dans un milieu aqueux à un pH entre 7 et 10. Le traitement est effectué d'une manière appropriée à la température ambiante. Il faut utiliser une quantité suffisante du composé imino de la formule III dans le traitement de manière à bloquer tous les groupes amino primaires dans la substance représen-
30 tée par la formule II pour minimiser ainsi l'auto-copulation lorsque le dérivé imidazolyle diazotisé est utilisé pour la copulation.

La diazotisation peut être effectuée sous les conditions normalement employées pour les réactions de diazotisation ; par

exemple, on mélange le dérivé imidazolyle de la formule Ia avec une solution aqueuse de nitrite de sodium et on traite le mélange entre 0° et 4° avec l'acide chlorhydrique. On notera qu'on peut effectuer la diazotisation en utilisant un composé de la formule

5 Ia qui est insoluble dans l'eau.

Les composés de diazonium de la formule Ib ci-dessus peuvent être combinés selon un autre mode d'exécution de la présente invention avec une protéine, un phénol, une amine ou une base hétérocyclique ou avec des membranes cellulaires, de préférence

10 avec des protéines ou des membranes cellulaires.

La réaction de copulation peut être effectuée lorsque l'une des composante de la réaction est insoluble dans l'eau. En général, on effectue la réaction d'une manière appropriée in situ ; c'est-à-dire sans isolement du sel de diazonium du milieu dans

15 lequel il est préparé. La réaction de copulation est effectuée en général à la même température que la diazotisation susmentionnée (par exemple entre 0° et 4°). Lorsqu'un sel de diazonium est combiné avec une protéine, on a avantage à effectuer la réaction de copulation dans un tampon aqueux.

20 Les produits de la réaction de copulation sont utiles en immunochimie ; par exemple, pour la détection et l'évaluation d'anticorps ou pour la détection de récepteurs sur les membranes cellulaires.

Exemple 1

A) Préparation de l'anticorps du lapin anti-humain O de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl) :

L'anticorps du lapin aux érythrocytes humain du groupe O
5 est purifié en partie par précipitation du sérum et chromatographie sur de la DEAE-cellulose. Un mélange d'une solution de l'anticorps résultant (1 ml contenant 30 mg de protéine), de 4 ml d'une solution de bicarbonate de sodium 0,5 M et de 100 mg de N-(carbamoyl-cyano-méthyl)-acétimide d'éthyle est agité
10 à la température ambiante pendant 8 heures, puis dialysé jusqu'au lendemain contre un tampon de phosphate, la solution de tampon de phosphate étant changée 1 fois durant la dialyse. La solution restant dans le bac de dialyse (5,5 ml) contient l'anticorps du lapin anti-humain O de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl).

15 B) Diazotisation et copulation de l'anticorps du lapin anti-humain O de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl) :

Toutes les solutions, les réactifs et les récipients sont refroidis à 4° et toutes les opérations sont effectuées à cette température ; les solutions sont bien mélangées après chaque
20 addition de réactif.

i) Diazotisation :

0,05 ml de l'anticorps du lapin anti-humain O de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl) obtenu comme décrit sous A ci-dessus et 0,08 ml d'une solution de nitrite de sodium à 0,4%
25 sont mélangés. On ajoute alors 0,08 ml d'acide chlorhydrique 1 N, puis, 30 secondes plus tard, 0,08 ml d'une solution de sulfamate d'ammonium à 2%. Après encore 20 secondes, la solution résultante de diazonium est utilisée dans les réactions de copulation ci-après.

30 11a) Copulation en l'albumine sérique de bovin :

La solution de diazonium fraîchement préparée est ajoutée à l'aide d'une pipette de Pasteur à une solution vigoureusement agitée d'albumine sérique de bovin (20 mg) dans un tampon d'acétate de sodium (pH 4,6) traitée au préalable avec 0,08 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 1N. Après repos pendant 1 heure à 4°, l'ampleur de la copulation est évaluée à l'aide de la réaction de l'antigène aux érythrocytes. On trouve que les érythrocytes humains du groupe O sensibilisés avec la préparation sont agglutinés par la globuline sérique anti-lapin (ceci montre que le couple anticorps de lapin anti-humain O/albumine sérique de bovin adhère aux cellules) et par une albumine sérique anti-sérum bovin (indiquant que l'albumine sérique de bovin est liée à l'anticorps de lapin anti-humain O), mais pas par le sérum de lapin normal.

15 iib) Copulation en la β -lactoglobuline:

La solution de diazonium fraîchement préparée est ajoutée avec une pipette de Pasteur à une solution de β -lactoglobuline dans un tampon d'acétate présentant le pH 4,8 (30 mg dans 3 ml) se trouvant dans un récipient refroidi muni d'une électrode de verre pour mesurer le pH de la solution. Le pH s'abaisse pendant l'addition. Une solution d'hydroxyde de sodium 1M est ajoutée de manière à amener le pH à sa valeur initiale et, après encore 10 minutes, le pH est amené à une valeur entre 7 et 7,5 avec une nouvelle quantité d'hydroxyde de sodium. La solution est maintenue à 4° jusqu'au lendemain, centrifugée pour éliminer le résidu insoluble et la partie surnageante est stockée à -20°. On évite des congélations et des fusions répétées.

Les érythrocytes humains du groupe O sensibilisés avec une dilution de la partie surnageante dans un tampon de phosphate sont agglutinés par une anti- β -lactoglobuline sérique de lapin. Les cellules ne s'agglutinent pas en présence du tampon de phosphate seul ou en présence de sérum de lapin normal.

Exemple 2A) Préparation de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl)-ovalbumine :

100 mg d'ovalbumine, 6 ml d'une solution de bicarbonate de sodium 0,5 M et 10 mg de N-(carbamoyl-cyano-méthyl)-acétimide d'éthyle sont agités ensemble à la température ambiante pendant 24 heures, puis dialysés plusieurs fois contre une solution salée tamponnée au phosphate pour éliminer les réactifs inaltérés et les produits secondaires. La solution restante contient la (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl)-ovalbumine.

B) Diazotisation et copulation de l'anticorps de lapin anti-humain O de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl) :

Toutes les opérations avant l'addition du tampon de phosphate 9,2 dans la réaction de copulation décrite ci-après sont effectuées à 4° avec des solutions, des réactifs et des récipients refroidis à cette température.

i) Diazotisation :

10 µl d'acide chlorhydrique 1N sont ajoutés à un mélange de 50 µl de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl)-ovalbumine dans une solution salée tamponnée au phosphate (centrifugée immédiatement avant l'utilisation pour éliminer la substance insoluble) et 10 µl d'une solution aqueuse de nitrite de sodium à 0,1%. Après diazotisation pendant 30 secondes, on ajoute 10 µl d'une solution de sulfamate d'ammonium à 2%. La solution est mélangée et, après encore 20 secondes, la solution résultante de diazonium est utilisée dans la réaction de copulation décrite ci-après.

ii) Copulation en érythrocytes de poulet :

La solution fraîchement préparée de diazonium est traitée avec 1 ml d'une suspension à 2% d'érythrocytes de poulet dans un

tampon de phosphate au pH 5,1. Les érythrocytes de poulet sont lavés avant l'utilisation 3 fois avec une solution salée tamponnée au phosphate. Le mélange est immédiatement transféré dans un tube de centrifugeuse à 4° et, 3 minutes plus tard, 10 ml d'une solution tampon de phosphate au pH 9,2 sont ajoutés à la température ambiante. A partir de ce moment, toutes les opérations sont effectuées à la température ambiante. 10 minutes après l'addition du tampon au pH 9,2 les cellules sont centrifugées dans une centrifugeuse tournant à 2000 tours par minute, 2/3 de la partie surnageante sont éliminés et remplacés par la solution salée tamponnée au phosphate. Les cellules sont remises en suspension et de nouveau centrifugées à 2000 tours par minute. Toute la partie surnageante est éliminée et les cellules agglomérées sont lavées 2 fois avec chaque fois 10 ml d'une solution salée tamponnée au phosphate. Finalement, les cellules sont mises en suspension dans une quantité assez grande d'une solution salée tamponnée au phosphate pour les amener à leur concentration initiale. Les cellules revêtues sont agglutinées par l'anti-ovalbumine sérique du lapin.

Les tampons susmentionnés ont la composition suivante :

20 tampon de phosphate pH 9,2 : 17,75 g d'orthophosphate disodique dissous dans une quantité d'eau suffisante pour produire un litre de solution.

25 tampon de phosphate pH 5,1 : 27,6 g d'orthophosphate monosodique dihydraté dissous dans une quantité suffisante d'eau pour donner un litre de solution, puis ajusté au pH 5,1 par addition d'une solution tampon de phosphate pH 9,2.

30 solution salée tamponnée au phosphate : un litre de solution contient 8,0 g de chlorure de sodium, 0,2 g de chlorure de potassium, 1,15 g d'orthophosphate disodique anhydre, 0,2 g d'orthophosphate monopotassique et de l'eau distillée ad 1 litre.

Exemple 3

Selon le processus décrit dans l'exemple 2A, on prépare l'albumine sérique de bovin de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl) qui est diazotisé suivant le processus décrit dans l'exemple 2Bi) et copulé avec des érythrocytes de mouton de la manière décrite dans l'exemple 2Bii). Les cellules résultantes revêtues d'antigène sont agglutinées par l'albumine sérique anti-sérum bovin seule. Lorsque les cellules revêtues sont utilisées dans une variante du test sur agar selon Jerne sur une population cellulaire dérivée de ganglions lymphatiques de la souris, les cellules produisant des anticorps (PFC) peuvent être détectées et comptées.

Exemple 4

Suivant le processus décrit dans l'exemple 2A, on prépare l'albumine sérique de bovin de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl) qui est diazotisé comme décrit dans l'exemple 2Bi) et copulé avec des érythrocytes humains du groupe O suivant le processus décrit dans l'exemple 2Bii). Les cellules revêtues sont agglutinées par l'albumine sérique anti-sérum bovin.

20

Exemple 5

Suivant le processus décrit dans l'exemple 2A, on prépare le dérivé de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl) d'un extrait aqueux de pollen de timothe. Celui-ci est diazotisé selon le processus décrit dans l'exemple 2Bi), puis copulé avec des érythrocytes humains du groupe O de la manière décrite dans l'exemple 2Bii). Les cellules revêtues sont agglutinées par le sérum anti-pollen de lapin. Elles forment des rosettes avec une forte proportion de cellules basophiles sanguines provenant d'une personne souffrant du rhume des foins. Les cellules basophiles provenant d'une personne ne souffrant pas du rhume des foins sont

testées comme témoins et ne réagissent pas.

Exemple 6

Le dérivé de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-1-imidazolyl)
d'un extrait dériciné de graines de ricin est préparé comme
5 décrit dans l'exemple 2A et diazotisé suivant le processus
décrit dans l'exemple 2Bi). La copulation du produit de diazo-
tisation avec les érythrocytes humains du groupe O conformément
au processus décrit dans l'exemple 2Bii) fournit des cellules
revêtues qui sont agglutinées par la protéine sérique de lapin
10 anti-ricin. Les cellules sont aussi utilisées pour démontrer,
par la formation de rosette, l'allergisation passive in vitro
de basophiles humains avec le sérum contenant des anticorps
réaginisques IgE à l'allergène du ricin.

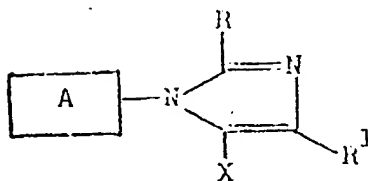
Exemple 7.

15 L'albumine sérique humaine de (2-méthyl-4-carbamoyl-5-amino-
1-imidazolyl) est préparée selon le processus décrit dans l'exem-
ple 2A. Elle est diazotisée avec un mélange de 200 µl de nitrite
de sodium à 0,4% et 300 µl d'acide chlorhydrique 1N. Après
30 secondes, 200 µl d'une solution de sulfamate d'ammonium à 2%
20 sont ajoutés et, 20 secondes plus tard, tout le mélange est
ajouté à une solution d'anticorps de lapin anti-humain O dans
un tampon d'acétate au pH 4,8 (1,5 ml d'une solution contenant
2 mg de protéine par ml). On amène le pH à la valeur désirée
comme décrit dans l'exemple 1Bii) et le mélange est finalement
25 centrifugé pour éliminer la substance insoluble.

Une portion de la partie surnageante est testée à l'aide
de la réaction de l'antigène liée aux érythrocytes. Les cellules
revêtues sont agglutinées par l'albumine sérique anti-sérum
humain et par la globuline sérique anti-lapin, mais pas par
30 le sérum humain normal.

REVENDEICATIONS

1. Dérivés d'imidazol de la formule générale

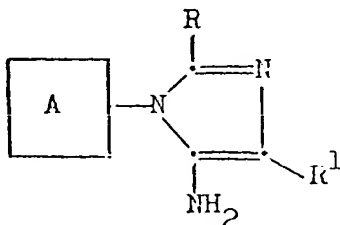


I

dans laquelle A représente le radical d'un polypeptide,
 d'une protéine, d'un polysaccharide ou polymère aminé con-
 5 tenant au moins 1 groupe amino aliphatique pri-
 maire, R représente un atome d'hydrogène ou un groupe
 alcoyle, R^1 représente un atome d'hydrogène ou un groupe
 aminocarbonyle (qui peut être mono- ou disubstitué par
 de l'alcoyle) ou un groupe alcoxy-carbonyle, aralcoxy-
 10 carbonyle ou cyano, et X représente un groupe $-NH_2$ ou
 $-N \equiv N^+$,

et des couples de composés de la formule I dans laquelle X désigne
 $-N \equiv N^+$ avec une protéine, un phénol, une amine ou une base hété-
 rocyclique ou avec des membranes cellulaires.

15 2. Un composé suivant la revendication 1 de la formule gé-
 nérale

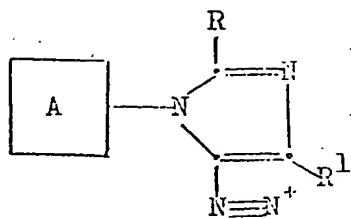


Ia

dans laquelle A, R et R^1 ont la même signification que

dans la revendication 1.

3. Un composé suivant la revendication 1 de la formule générale



dans laquelle A, R et R¹ ont la même signification que dans la revendication 1.

4. Un composé suivant la revendication 1, qui est un couple d'un composé de diazonium de la formule générale Ib comme défini dans la revendication 3 avec une protéine, un phénol, une amine ou une base hétérocyclique ou avec des membranes cellulaires.

5. Un composé suivant l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que tout groupe alcoyle présent est un groupe alcoyle inférieur et tout groupe alcoxycarbonyle présent est un groupe alcoxycarbonyle inférieur.

6. Un composé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que R représente le groupe méthyle et R¹ représente un groupe amino-carbonyle.

7. Un composé suivant l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que A représente le radical d'une protéine ou d'un polypeptide.

8. Un composé suivant la revendication 7, caractérisé en ce que A représente le radical d'un anticorps de lapin au érythrocytes humains du groupe O.

9. Un composé suivant la revendication 7, caractérisé en ce

que A représente le radical de l'insuline.

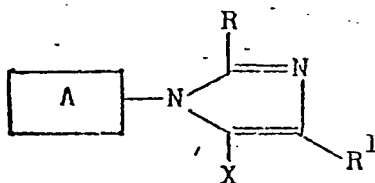
10. Un composé suivant la revendication 7, caractérisé en ce que A représente le radical des composantes protéiniques de l'extrait de pollen de timothe.

5 11. Un composé suivant l'une des revendications 1 et 4 à 10, qui est un couple d'un composé de la formule générale Ib comme défini dans la revendication 3 avec une protéine, un phénol ou une base hétérocyclique.

10 12. Un composé suivant la revendication 11, qui est un couple d'un composé de la formule générale Ib comme décrit dans la revendication 3 avec une protéine.

13. Un composé suivant l'une des revendications 1 et 4 à 10 qui est un couple d'un composé de la formule générale Ib comme défini dans la revendication 3 avec des membranes cellulaires.

15 14. Un procédé pour la préparation de dérivés d'imidazole de la formule générale



dans laquelle A représente le radical d'un polypeptide, d'une protéine, d'un polysaccharide ou polymère aminé contenant au moins 1 groupe amino aliphatique primaire, R représente un atome d'hydrogène ou un groupe alcoyle, R¹ représente un atome d'hydrogène ou un groupe aminocarbonyle (qui peut être mono- ou disubstitué par de l'alcoyle) ou un groupe alcoxycarbonyle, aralcoxy-carbonyle ou cyano, et X représente un groupe -NH₂ ou -N≡N⁺,

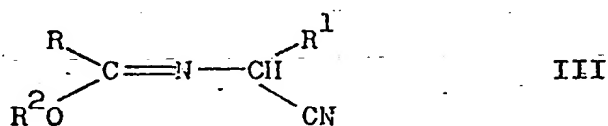
20

25

et de couples de composés de la formule I dans laquelle Λ représente un groupe $\text{N}\equiv\text{N}^+$ avec une protéine, un phénol, une amine ou une base hétérocyclique ou avec des membranes cellulaires, lequel procédé est caractérisé en ce qu'on traite un composé de la formule

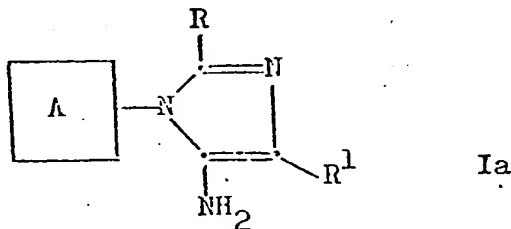


5 dans laquelle Λ a la même signification que ci-dessus, avec un composé imino de la formule générale



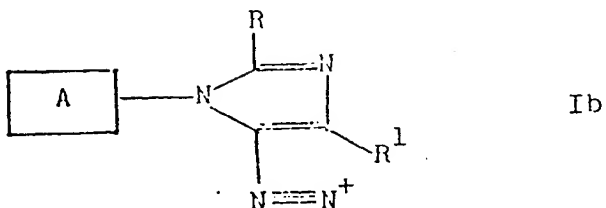
dans laquelle R et R^1 ont la même signification que ci-dessus et R^2 représente un groupe alcoyle,

le cas échéant, en ce qu'on diazote le dérivé imidazolyle résultant de la formule générale



dans laquelle Λ , R et R^1 ont la même signification que ci-dessus,

de manière à obtenir le composé diazonium correspondant de la formule générale



dans laquelle A, R et R¹ ont la même signification que ci-dessus,

- 5 et, le cas échéant, en ce qu'on copule ledit composé diazonium de la formule Ib avec une protéine, un phénol, une amine ou une base hétérocyclique ou avec des membranes cellulaires.

15. Un procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce que le traitement de la substance de la formule II avec le
10 composé imino de la formule III est effectué dans un milieu aqueux à un pH entre 7 et 10.

16. Un procédé suivant l'une des revendications 14 et 15, caractérisé en ce que le traitement de la substance de la formule II avec le composé imino de la formule III est effectué à la tem-
15 pérature ambiante.

17. Un procédé suivant l'une des revendications 14 à 16, caractérisé en ce que la réaction de copulation du composé de diazonium de la formule Ib avec une protéine, un phénol, une amine ou une base hétérocyclique ou avec des membranes cellulai-
20 res est effectuée sans isolement dudit composé de diazonium à partir du milieu dans lequel il est préparé.

18. Un procédé suivant l'une des revendications 14 à 16, caractérisé en ce qu'un composé de la formule Ia est préparé.

19. Un procédé suivant l'une des revendications 14 à 16,

caractérisé en ce qu'un composé de la formule Ib est préparé.

20. Un procédé suivant l'une des revendications 14 à 17, caractérisé en ce qu'on prépare un couple d'un composé de diazonium de la formule Ib avec une protéine, un phénol, une amine 5 ou une base hétérocyclique ou avec des membranes cellulaires.

21. Un procédé suivant l'une des revendications 14 à 20, caractérisé en ce que tout groupe alcoyle présent est un groupe alcoyle inférieur et tout groupe alcoxycarbonyle présent est un groupe alcoxycarbonyle inférieur.

10 22. Un procédé suivant l'une des revendications 14 à 21, caractérisé en ce que R représente le groupe méthyle, R¹ représente un groupe aminocarbonyle et R² représente le groupe éthyle.

23. Un procédé suivant l'une des revendications 14 à 22, caractérisé en ce qu'on utilise une protéine ou un polypeptide 15 comme substance représentée par la formule II.

24. Un procédé suivant la revendication 23, caractérisé en ce que ladite protéine est l'anticorps de lapin aux érythrocytes humains du groupe O.

25. Un procédé suivant la revendication 23, caractérisé en 20 ce que ladite protéine est l'insuline.

26. Un procédé suivant la revendication 23, caractérisé en ce que ladite protéine consiste en les composantes de protéine de l'extrait de pollen de timothe.

27. Un procédé suivant l'une des revendications 14 à 17, 25 et 20 à 26, caractérisé en ce que le composé de diazonium de la formule Ib est copulé avec une protéine, un phénol, une amine ou une base hétérocyclique.

28. Un procédé suivant la revendication 27, caractérisé en ce que ledit composé de diazonium est copulé avec une protéine.

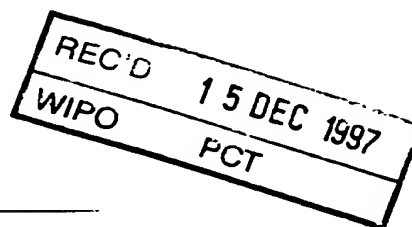
29. Un procédé suivant l'une des revendications 14 à 17 et 20 à 26, caractérisé en ce que le composé de diazonium de la formule Ib est copulé avec des membranes cellulaires.

30. Les produits obtenus suivant le procédé ^{d'une}/des revendica-
5 tions 14 à 29.

09/297519



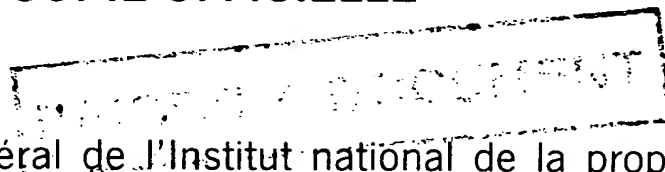
PCT/FR 97/02022



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE



Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 DEC. 1997

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

carja
N° 25-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

16 bis, rue de Saint Pétersbourg

7500 Paris Cedex 08

téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 13990

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

15 NOV. 1996

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

GROSSET-FOURNIER & DEMACHY SARL
103, rue La Fayette
F-75481 PARIS CEDEX 10

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire



demande initiale

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

n° du pouvoir permanent références du correspondant

téléphone

IFB96AP IDM HIS 01.42.81.09.58

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

"NOUVEAUX COMPLEXES D'ACIDES NUCLEIQUES ET DE POLYMERES SUBSTITUE PAR DES RESIDUS
ENTRAÎNANT LA DESTABILISATION DES MEMBRANES CELLULAIRES".

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

I.D.M. IMMUNO-DESIGNED MOLECULES

Forme juridique

Nationalité (s)

Adresse (s) complète (s)

Pays

10, rue de Charonne
F-75011 PARIS

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PREPOSÉ À LA RECEPTION SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Catherine GROSSET-FOURNIER (422.5/PP.112)
Co-Gérant, GROSSET-FOURNIER & DEMACHY SARL

2022

[Signature]

Division Administrative des Brevets

IFB96AP IDM HIS

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

96.13990

Titre de l'invention :

"NOUVEAUX COMPLEXES D'ACIDES NUCLEIQUES ET DE POLYMERES SUBSTITUE PAR DES RESIDUS ENTRAINANT LA DESTABILISATION DES MEMBRANES CELLULAIRES".

Le (s) soussigné (s)

Catherine GROSSET-FOURNIER
GROSSET-FOURNIER & DEMACHY SARL
103, rue La Fayette
F-75481 PARIS CEDEX 10

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

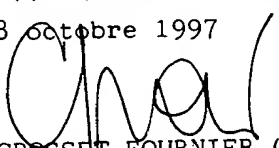
1) MIDOUX Patrick
21, rue du Poinçon
F-45100 ORLEANS
FRANCE

2) MONSIGNY Michel
341, rue des Bouvreuils
F-45590 SAINT-CYR-EN-VAL
FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 8 octobre 1997


Catherine GROSSET-FOURNIER (422.5/PP.112),
Co-Gérant GROSSET-FOURNIER & DEMACHY SARL

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
difiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
62664			X	15/01/87	7 10 1987 - 8 8

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

NOUVEAUX COMPLEXES D'ACIDES NUCLEIQUES ET DE POLYMERES SUBSTITUE PAR DES RESIDUS ENTRAINANT LA DESTABILISATION DES MEMBRANES CELLULAIRES

5 L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acides nucléiques et de polymère substitué par des résidus entraînant la déstabilisation des membranes cellulaires.

10 L'introduction d'un gène étranger dans une cellule est la base de la thérapie génique. Le transfert de gènes peut être obtenu en utilisant soit un matériel viral modifié (virus de la vaccine, rétrovirus, adénovirus ou virus de l'herpès), soit en utilisant des vecteurs non viraux (lipides cationiques, liposomes). Les premiers bien qu'efficaces, présentent des problèmes de sécurité. Pour les derniers, l'efficacité est fortement diminuée en présence de sérum et de ce fait leur utilisation est restreinte à l'*in vitro* ou à l'*ex vivo*.

15 La polylysine qui peut former des complexes électrostatiques stables avec un ADN plasmidique est à la base du développement de vecteurs non viraux pour transférer des gènes dans des cellules animales.

20 Les complexes d'ADN et de polylysine non substituée ne sont généralement pas efficaces pour transfecter des cellules du fait de la très grande stabilité des complexes (donc dissociation et relargage de l'ADN faibles) dans les conditions physiologiques par suite d'une très grande coopérativité des interactions polycation-polyanion.

25 L'efficacité de transfection peut être améliorée lorsque le nombre de charges présent sur le polypeptide est diminué afin de réduire les forces d'interactions entre l'ADN et la polylysine. Par exemple, lorsque 40% des fonctions $\varepsilon\text{-NH}_3^+$ des résidus lysine de la polylysine sont partiellement neutralisées par des dérivés polyhydroxyalcanoyles tels que la δ -gluconolactone, les complexes ADN/polylysine partiellement gluconoylée sont plus efficaces que les complexes ADN/polylysine pour transfecter les cellules.

30 La polylysine peut être substituée par des ligands spécifiques de récepteurs présents à la surface des cellules et capables d'induire une endocytose spécifique des complexes avec un ADN plasmidique par des cellules cibles.

35 Des conjugués obtenus en substituant de la polylysine par l'asialoorosomucoïde, la transferrine, l'insuline, des immunoglobulines et des facteurs de croissance ont été proposés comme vecteurs guides de plasmides. Cependant, ces ligands protéiques rendent les complexes très immunogéniques.

La polylysine peut être substituée par des ligands de petite masse moléculaire moins immunogènes tels que des osides et oligosides reconnus par

des récepteurs membranaires spécifiques (lectines membranaires) à la surface des cellules cibles. La polylysine glycosylée a été proposée comme vecteurs non viraux parfaitement définis pour transférer des gènes.

De nombreuses cellules animales possèdent des lectines membranaires qui reconnaissent des oligosides de structures variées et qui induisent l'endocytose de leurs ligands. Par exemple, la lectine membranaire des cellules du parenchyme hépatique reconnaît des structures glucidiques comportant un résidu galactose en position terminale, ce qui est le cas des glycoprotéines sériques désialylées. La spécificité des lectines membranaires dépend du type cellulaire et de l'état de différenciation des cellules.

L'efficacité de la transfection des complexes ADN/polylysine glycosylée dépend du taux de substitution de la polylysine par des osides : les transfections les plus efficaces sont obtenues lorsque 30 à 40% des fonctions $\epsilon\text{-NH}_3^+$ des résidus lysine de la polylysine sont substituées par des mono- ou des dissacharides.

Dans le brevet français n° 2,719,316, il a été montré que l'utilisation de la polylysine partiellement gluconoylée comportant un nombre des charges positives déjà réduit permet d'abaisser d'un facteur 5 à 10 le nombre d'osides qu'il est nécessaire de fixer sur le polymère pour obtenir une bonne efficacité de transfection des complexes ADN/polylysine glycosylée et gluconoylée. L'utilisation de la polylysine partiellement gluconoylée permet d'augmenter la solubilité des complexes et de réduire leur taille aux environs de 50 nm.

Le transport des plasmides par des vecteurs non viraux susceptibles d'être reconnus spécifiquement par des composés de la membrane plasmique des cellules relève d'une démarche imitant le mécanisme d'entrée du matériel génétique viral dans une cellule. Dans tous les cas décrits, les complexes ADN/polymère polycationique sont entraînés dans des vésicules d'endocytose, dans des endosomes et probablement dans d'autres compartiments intracellulaires plus profonds, éloignés de la membrane plasmique.

Le passage transmembranaire de l'ADN plasmidique est de ce fait une étape critique vis à vis de la libération dudit ADN dans le cytosol pour son passage dans le noyau, où le gène sera exprimé.

Dans tous les cas décrits, des auxiliaires de passage transmembranaire sont utilisés pour favoriser le passage de l'ADN dans le cytosol. Il s'agit :

- de la chloroquine
- d'adénovirus défectifs
- des peptides perméabilisants et/ou fusiogènes

a) La chloroquine est une base faible utilisée à 50 μM ou 100 μM en

culture *in vitro*, pour certaines cellules ces concentrations sont toxiques. La chloroquine, qui est perméante traverse la membrane et s'accumule dans les compartiments acides, parce qu'elle comporte des amines de faible pK qui captent des protons ; la chloroquine protonée est cationique et moins perméante.

5 L'acidification des endosomes et des lysosomes est due à une enzyme membranaire qui injecte des H^+ à partir du cytosol, dans les vésicules ; pour rétablir l'électroneutralité cette accumulation de proton s'accompagne d'une entrée d'ions chlorure Cl^- . Au fur et à mesure que la chloroquine s'accumule, les protons et les chlorures s'accumulent également, ce qui provoque une

10 augmentation de la force ionique intravésiculaire qui induit l'arrivée d'eau, d'où le gonflement des vésicules et leur déstabilisation. La concentration intracellulaire de la chloroquine peut être plus de 100 fois supérieure à sa concentration dans le milieu, après quelques heures. Elle peut donc dépasser 10 mM. Ce phénomène est comparable à ce qui se passe chez les personnes qui

15 utilisent une dose quotidienne de 300 mg de chloroquine par jour. Après quelques jours, la concentration plasmatique est aux environs de $0,7 \mu M$, la concentration tissulaire est 200 à 700 fois plus élevée, soit 140 à $500 \mu M$. Et à l'intérieur des cellules, les compartiments acides peuvent atteindre des concentrations plusieurs dizaines de fois plus fortes. On sait par ailleurs que des

20 concentrations 10 mM de chloroquine (concentration obtenue après quelques heures en ayant utilisé une concentration initiale de chloroquine de $100 \mu M$) favorise la dissociation des complexes ADN/polylysine.

La chloroquine en association avec les complexes ADN/polylysine dans le transfert de gène n'est utilisable que dans des applications *in vitro* ou *ex vivo* du fait de sa toxicité et de sa rapide dilution après injection chez l'individu. En

25 effet, *in vivo*, pour atteindre les concentrations élevées citées ci-dessus, il faut plusieurs jours. Or il a été montré *in vitro* que dans les cellules prétraitées à la chloroquine, l'expression des gènes transférés était très faible. En outre, si la chloroquine est ajoutée plus de quatre ou cinq heures après l'incubation des

30 cellules en présence des complexes, la transfection est très faible. C'est pour ces raisons que la chloroquine, qui est un très bon auxiliaire *in vitro*, n'est pas efficace *in vivo*.

b) Les propriétés fusiogènes en milieu acide des particules d'adénovirus défectifs sont utilisées pour favoriser le passage de l'ADN dans le cytosol à

35 partir des vésicules d'endocytose. Les adénovirus possèdent des protéines de fusion actives en milieu légèrement acide. Les adénovirus défectifs peuvent être utilisés libres ou fixés aux complexes ADN/polylysine.

L'utilisation de particules virales même défectives pose cependant des

problèmes de sécurité. Les adénovirus induisent une très forte réponse immune après injection avec les complexes.

c) Des peptides perméabilisants et/ou fusiogènes en milieu légèrement acide sont utilisés comme auxiliaires pour favoriser le passage de l'ADN dans le cytosol. Il s'agit principalement de peptides de 20 acides aminés dérivant des protéines de fusion de virus comme par exemple le peptide *N*-terminal de la sous unité HA2 de l'hémagglutinine du virus de la grippe, ou de peptides synthétiques tels que le GALA, un oligomère contenant plusieurs unités de répétition Glu-Ala-Leu-Ala. Ces peptides sont utilisés le plus souvent à l'état libre (c'est-à-dire non fixés covalamment) avec les complexes ADN/polylysine. L'efficacité des peptides est fortement diminuée en présence de sérum dans les milieu de culture cellulaire ce qui restreint leur utilisation aux expériences *in vitro* ou au *ex vivo*. Certains peptides fixés covalamment aux complexes ADN/polylysine sont encore efficaces pour favoriser le passage transmembranaire de l'ADN, d'autres perdent leur pouvoir perméabilisant après fixation.

On sait, par ailleurs, qu'il existe d'autres molécules capables de déstabiliser des membranes et en particulier des molécules contenant le noyau imidazole de l'histidine ($pK = 6,04$) en se protonant en milieu légèrement acide devient cationique. La polyhistidine possède des propriétés fusiogène et perméabilisante vis-à-vis des bicouches lipidiques. A $pH < 6$, la polyhistidine adopte une structure en hélice α (Norland K.S. *et al.* (1963) *Biopolymers* 1:277-278 ; Beychok S. *et al.* (1965) *J. Amer. Chem. Soc.* 87:3990-3991). Il a été montré que la polyhistidine en milieu légèrement acide est un polycation qui agrège des liposomes chargés négativement et induit leur fusion (Wang C.-Y. et Huang L. (1984) Polyhistidine mediates an acid-dependent fusion of negatively charged liposomes. *Biochemistry* 23:4409-4416 ; Uster P.S. et Deamer D.W. (1985) pH-dependent fusion of liposomes using titrable polycations. *Biochemistry* 24:8-14).

On sait qu'un polymère synthétique (la cétylacétyl(imidazol-4-ylméthyl)polyéthyleimine) à pH légèrement acide induit la fusion de liposomes (Oku N. *et al.* (1987) Low pH induced membrane fusion of lipid vesicles containing proton-sensitive polymer. *Biochemistry* 26:8145-8150).

On sait également qu'un polymère neutre hydrosoluble substitué par des résidus histidyle (utilisé à la place de la polyhistidine très peu soluble en milieu aqueux) interagit uniquement en milieu légèrement acide avec un polyanion tel que l'acide polyaspartique et est capable de perméabiliser la membrane plasmique des cellules dans un test de cytométrie en flux en utilisant le bromure

d'éthidium comme marqueur (Midoux *et al.*, 1995).

Des résultats préliminaires ont montré que la polyhistidine (très peu soluble en milieu aqueux à pH neutre) ne peut être utilisée pour transférer des cellules car n'étant pas un polycation à pH neutre, elle n'est pas capable de former avec de l'ADN des complexes stables ayant une solubilité suffisante pour pouvoir être utilisé à pH neutre, en particulier à pH 7,4, le pH du plasma.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué susceptibles de transférer plusieurs types cellulaires.

L'invention a pour objet un nouveau type de polymère cationique comprenant, outre les charges positives du polymère, des substituants favorisant le passage transmembranaire de l'acide nucléique transporté et, le cas échéant, des substituants agissant en tant que signaux de reconnaissance. Les substituants favorisant le passage transmembranaire sont liés au polymère et sont des dérivés qui ne sont pas cationiques en milieu légèrement alcalin, mais le deviennent en milieu neutre et en milieu acide.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué susceptibles de favoriser le passage transmembranaire de l'ADN après endocytose des complexes.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué ne présentant pas de signaux de reconnaissance reconnus par des récepteurs membranaires à la surface des cellules.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué présentant en outre des signaux de reconnaissance reconnus par des récepteurs membranaires à la surface des cellules, conférant un caractère sélectif de la transfection vis-à-vis de différents types cellulaires.

L'invention a pour objet un procédé de transfection spécifique *in vitro* et *in vivo*.

L'invention a pour objet de nouveaux conjugués de polylysine substituée ne présentant pas de signaux de reconnaissance reconnus par des récepteurs membranaires à la surface des cellules, susceptibles d'être complexés à un acide nucléique en vue de la transfection d'une cellule.

L'invention a également pour objet de nouveaux conjugués de polylysine présentant en outre des signaux de reconnaissance reconnus par des récepteurs membranaires à la surface des cellules, susceptibles d'être complexés à un acide nucléique en vue de la transfection sélective d'une cellule.

L'intérêt de l'invention est que ces nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère sont susceptibles de transférer les cellules en l'absence d'auxiliaires de passage transmembranaire (chloroquine ou peptides

perméabilisants et/ou fusiogènes). Ce sont ici les groupements faiblement basiques, protonables (cation) en milieu légèrement acide, fixés sur le polymère qui jouent le rôle d'auxiliaires de passage transmembranaire.

L'intérêt de l'invention est que ces nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué sont aussi ou plus efficaces sans auxiliaires de passage transmembranaire que les complexes d'acide nucléique et de polymère non substitué ou substitué par des agents réduisant le nombre de charges du polymère (donc son interaction avec l'acide nucléique) en présence d'auxiliaires de passage transmembranaire.

Dans le cas de la chloroquine et des peptides perméabilisants et/ou fusiogènes, ces derniers sont de petites molécules qui diffusent rapidement s'ils ne sont pas liés covalamment aux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué.

L'intérêt de l'invention est que ces nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué sont aussi efficaces (voire plus efficaces) en présence de sérum qu'en absence de sérum pour transfecter les cellules

Dans une de ses définitions les plus générales, l'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose, et/ou des endosomes,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,
- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
- . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué,

facilitant le relargage de l'acide nucléique au cours de la dissociation du complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes :

- 5 . ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :
- 10 . soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),
- . soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl), notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus,
- 15 . soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),
- . soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),
- 20 sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

Par déstabilisation des membranes, on entend une modification de la membrane qui conduit soit à l'augmentation de sa perméabilité vis-à-vis de

25 molécules de soluté de faible masse moléculaire et éventuellement de haute masse moléculaire (y compris des acides nucléiques, des plasmides ou des complexes), soit à la fusion avec une autre membrane.

La perméabilité membranaire peut être mesurée par microscopie de fluorescence de la façon suivante :

- 30 Les cellules adhérentes sont incubées à 37°C pendant 15 à 30 minutes avec 0.5 ml de milieu de culture DMEM avec sérum contenant 5 mg/ml de dextran (Mw 4000) marqué avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FTC-Dextran) et un complexe ADN/polylysine histidylée. Les cellules sont ensuite lavées et incubées à 37°C pendant 15 à 30 minutes avec du milieu de culture
- 35 contenant 10% de sérum bovin foetal. Les cellules sont ensuite fixées pendant 5 minutes dans une solution de tampon phosphate salin contenant 4% de *p*-formaldéhyde et la fluorescence est analysée avec un microscope de fluorescence à plan confocal (MRC600 BioRad). En absence de perméabilisation

membranaire, la fluorescence provenant du FTC-Dextran est localisée exclusivement dans des vésicules. En présence d'un agent de perméabilisation membranaire, la fluorescence provenant du FTC-Dextran est en outre observée de manière diffuse dans le cytosol et le noyau des cellules.

5 La fusion des membranes en présence de complexes ADN/polylysine histidylée se mesure facilement dans des systèmes modèles tels que les liposomes en utilisant une méthode de mélange lipidique comme celle décrite dans Struck D.K. *et al.* (Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. (1981) *Biochemistry* 20:4093-4099). Brièvement, on utilise des
10 liposomes constitués de dioléoyl-phosphatidylcholine (DPOC) où sont insérés dans leur membrane du N-(7-nitrobez-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)phosphatidyl éthanolamine (NBD-PE) et de l'octadecylrhodamine (R18) comme marqueur fluorescent et des liposomes sans marqueurs fluorescents. On mesure la fluorescence du NBD ($\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$) en absence et en
15 présence de complexes ADN/polylysine histidylée à différents pH. La fusion des liposomes induit une diminution de la fluorescence du NBD par suite d'une diminution du transfert d'énergie entre la rhodamine et le NBD.

Ces nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué contenant des groupements faiblement basiques, protonables (cation) en milieu
20 légèrement acide en présence de sérum, sont donc mieux adaptés pour un transfert de gènes *in vivo* que les complexes ADN/polylysine ou ADN/polylysine gluconoylée qui ne sont actifs qu'en présence d'auxiliaires tels que la chloroquine ou des peptides fusiogènes et/ou perméabilisants.

Les résidus entraînent la déstabilisation des membranes cellulaires grâce à
25 leur propriété d'être protonables en milieu acide.

Les résidus entraînant la déstabilisation des membranes cellulaires sont des capteurs de protons qui limitent l'acidification des endosomes et, en conséquence, défavorisent la fusion entre les endosomes tardifs et les liposomes. On rappelle que les lysosomes sont des vésicules contenant un grand nombre
30 d'hydrolases et que ces lysosomes sont très efficaces pour dégrader les macromolécules biologiques en général et les acides nucléiques en particulier.

L'expression "milieu faiblement acide" désigne un milieu dont le pH est inférieur à celui du plasma ou du sérum, par exemple un pH inférieur à 7,4.

L'expression selon laquelle les résidus "ne sont pas actifs en tant que
35 signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire" signifie que, d'une part, à ce jour, il n'y a pas de récepteurs connus qui soient spécifiques de ces résidus et, d'autre part, que ces résidus ne sont pas utilisés en tant que ligands.

Une molécule ou un complexe moléculaire est actif en tant que signal de reconnaissance, s'il peut être reconnu sélectivement par un récepteur, c'est-à-dire qu'il joue le rôle d'un ligand, d'un agoniste ou d'un antagoniste.

Par signal de ~~reconnaissance reconnu~~ par un récepteur membranaire cellulaire, on désigne ~~généralement un ligand~~ (molécule ou complexe moléculaire) capable d'être reconnu sélectivement par ledit récepteur (affinité ligand-récepteur $\geq 10^3$ l/mole).

L'invention concerne notamment un complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose et/ou des endosomes,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ce sont des bases dont le pK en milieu aqueux est inférieur à 8, de sorte qu'une proportion supérieure à 50% de ces bases liée à un polymère cationique ne soit pas protonée en milieu neutre de pH 7,4,

- . ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par au cours de la dissociation du complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu

par un récepteur membranaire cellulaire,

- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

. soit par substitution de certaines fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),

. soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl), et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge,

. soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),

. soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

L'invention concerne également un complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

. ils appartiennent à la famille des composés comportant un noyau imidazole,

. ils appartiennent à la famille des quinolines,

. ils appartiennent à la famille des ptérines,

. ils appartiennent à la famille des pyridines,

. les susdits résidus comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

. ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu

par un récepteur membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, et/ou par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique au cours de la dissociation du complexe, sous réserve que l'ensemble des susdits résidus contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par au moins une molécule constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, et/ou par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes :

. ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

. soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),

. soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl) et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge,

. soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),

. soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

Les signaux de reconnaissance peuvent également entraîner une diminution des charges positives du conjugué polymérique lorsqu'ils sont eux-mêmes neutres ou acides et qu'ils sont liés au polymère par substitution d'une fonction

NH_3^+ entraînant la perte de la charge +.

Les signaux de reconnaissance sont des molécules de petite masse moléculaire (< 5000 daltons).

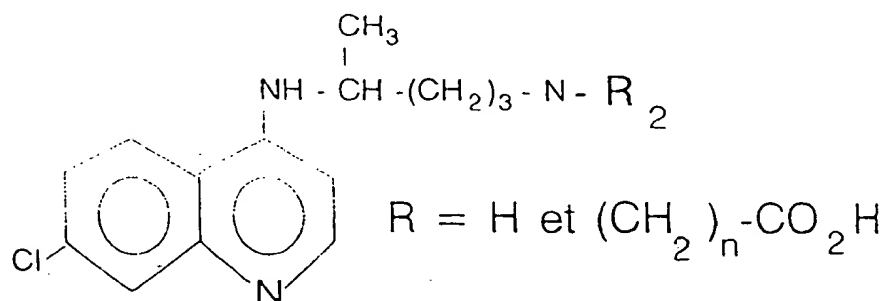
Le nombre de molécules de signal de reconnaissance fixé sur le polymère modifié peut être :

- pour une molécule signal de très haute affinité vis-à-vis de son récepteur ($K_a > 10^7$ l/mole), d'environ 0, 5 à 5, avantageusement 1 molécule pour environ 10 000 motifs monomères de polymère substitué soit 1 molécule pour environ 50 molécules de polymère substitué;

- pour une molécule signal de haute affinité vis-à-vis de son récepteur (K_a entre 10^5 l/mole et 10^7 l/mole), d'environ 0, 5 à environ 10, avantageusement 1 molécule pour environ 200 motifs monomères de polymère substitué soit 1 molécule pour environ 1 molécule de polymère substitué;

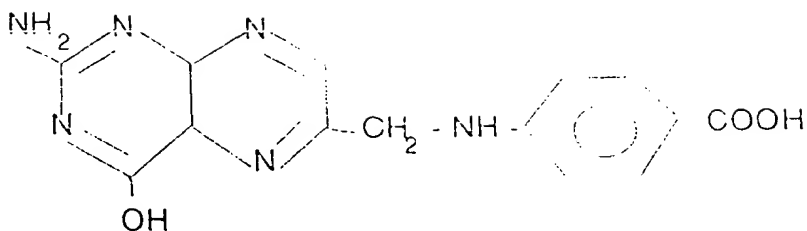
- pour une molécule signal de moyenne affinité vis-à-vis de son récepteur ($K_a < 10^5$ l/mole), d'environ 10 à environ 100, avantageusement 50 molécules pour environ 200 motifs monomères de polymère substitué soit 50 molécules pour environ 1 molécule de polymère substitué.

La famille des quinolines est représentée par la formule suivante :

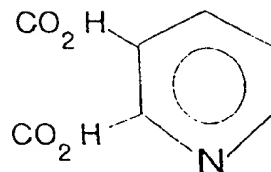
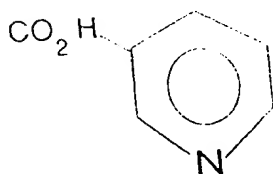


dans laquelle n vaut de 1 à 10, de préférence de 1 à 3.

La famille des ptérines est représentée par la formule suivante :



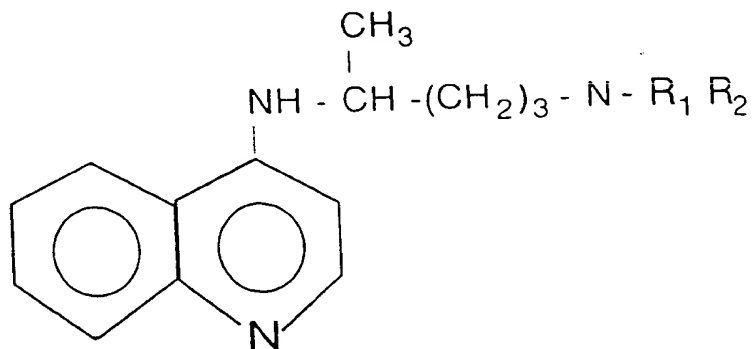
La famille des pyridines est représentée par les formules suivantes :



L'invention concerne également un complexe dans lequel les résidus entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires sont

- des alkylimidazoles dans lequel le radical alkyle comporte de 1 à 10, notamment de 2 à 6 atomes de carbone, et dans lequel un seul des atomes d'azote du noyau imidazole est substitué,

- ou des quinolines de formule :



dans laquelle R_1 représente H et R_2 représente $(CH_2)_n-CO_2-H$, n étant un nombre entier variant de 1 à 10, et de préférence valant de 1 à 3.

L'invention concerne également un complexe dans lequel les résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires sont choisis parmi :

5 histidine, 4-carboxyméthyl-imidazole, 3-(1-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 3-(3-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 2-carboxy-imidazole, histamine, acide 3-(imidazol-4yl)-L-lactique, 2-(1-méthyl-imidazol-4yl)éthylamine, 2-(3-méthyl-imidazol-4yl)éthylamine, β -alanyl-histidine-(carnosine), 7-chloro-4(amino-1-méthylbutylamino)-quinoline, N^4 -(7-chloro-4-quinoliny)-1,4-pentanediamine, 8-

10 (4-amino-1-méthylbutylamino)-6-méthoxy quinoline (primaquine), N^4 -(6-méthoxy-8-quinoliny)-1,4-pentanediamine, acide quininique, acide quinoline carboxylique, acide ptéroïque, acide nicotinique, acide quinolinique, et dans lequel

- la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus (par exemple histidine) peut être également substituée par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

L'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des

25 résidus de lysine ou d'ornithine, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, par des résidus entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ils comportent un noyau imidazole,
- . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,
- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance,

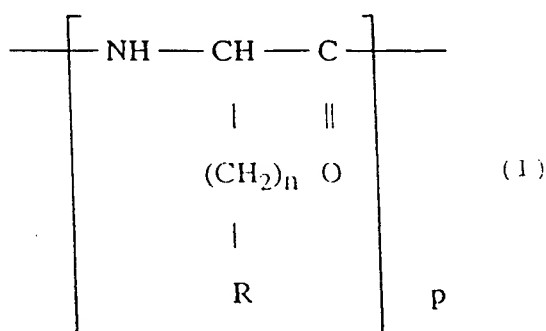
- les fonctions NH_3^+ libres restantes des susdits motifs monomères étant également substituées à raison d'environ 1% à environ 60% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant une masse moléculaire inférieure à 5000, ce signal de reconnaissance pouvant être présent à raison d'une molécule

35

pour environ 200 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 200 motifs du conjugué polymérique, sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

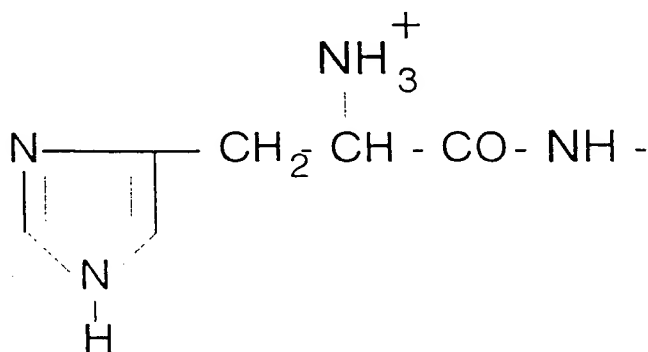
L'expression "non actifs en tant que signal de reconnaissance" signifie que, d'une part, à ce jour, il n'y a pas de récepteurs connus qui soient spécifiques de ces résidus et, d'autre part, que ces résidus ne sont pas utilisés en tant que ligands.

L'invention concerne également un complexe dans lequel le polymère contient un groupement polymérique de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- p est un nombre entier variant de 15 à 900, de préférence de 100 à 300,
- n est un nombre entier variant de 1 à 6, et vaut de préférence 4,
- ce groupement polymérique contient des radicaux R parmi lesquels :
 - . 10% à 45% du nombre de radicaux R représentant un résidu comportant un noyau imidazole et éventuellement une fonction NH_3^+ libre, notamment un résidu histidyle, R pouvant être représenté par la formule :



la fonction NH_3^+ éventuelle des susdits résidus pouvant être également substituée par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance,

. 10% à 90% du nombre de radicaux R, représentant les ω -amino NH_3^+ libres, et étant éventuellement substitué à raison de 0 à 50% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, notamment à raison de 0 à 60, avantageusement de 1 molécule pour environ 200 motifs, ou à raison de 2 à 100, avantageusement de 50 molécules pour environ 200 motifs, et/ou

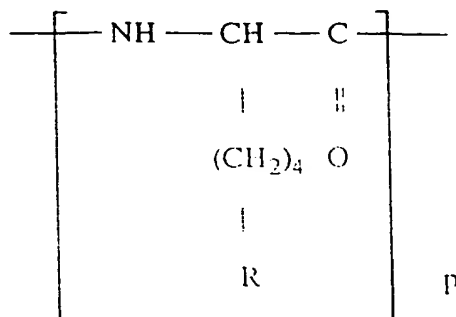
. R pouvant en outre être constitué de 0 à 45% par un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, notamment un reste dihydroxypropionoylamido, érythronoylamido, thréonoylamido, ribonoylamido, arabinoylamido, xylonoylamido, lyxonoylamido, gluconoylamido, galactonoylamido, mannonoylamido, glycoheptonoylamido, glycooctonoylamido, m est un nombre entier de 2 à 15, de préférence de 2 à 7, R_1 représente H ou un radical alcoyle de 1 à 15 atomes de carbone, notamment CH_3 , ces radicaux pouvant être substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

Dans cette classe de complexes de l'invention, le polymère est de la polylysine ou de la polyornithine.

Comme le montrent les exemples, les cellules HepG2 (hépatocarcinome humain) sont efficacement transfectées par de la polylysine substituée par 70 résidus histidyle.

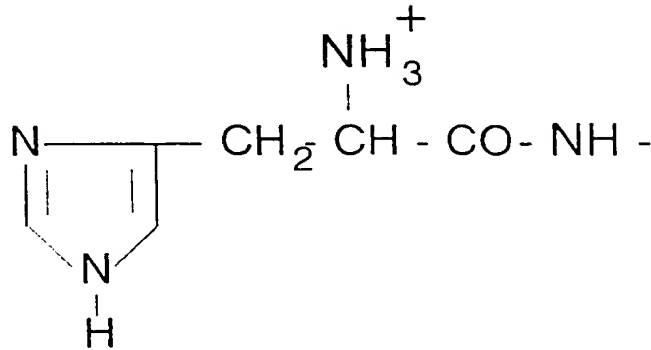
La polylysine substituée par $30 \pm 10\%$ d'histidine a permis de transfecter différentes cellules (humaines et murines, adhérentes ou en suspension) avec une grande efficacité, modulée selon le type cellulaire et le promoteur utilisé.

L'invention a également pour objet un complexe dans lequel le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II) suivante :



dans laquelle :

- p a les significations indiquées ci-dessus,
- 10% à 45% du nombre de radicaux R représentent un résidu comportant un noyau imidazole et éventuellement une fonction NH_3^+ libre, notamment un résidu histidyle, R pouvant être représenté par la formule



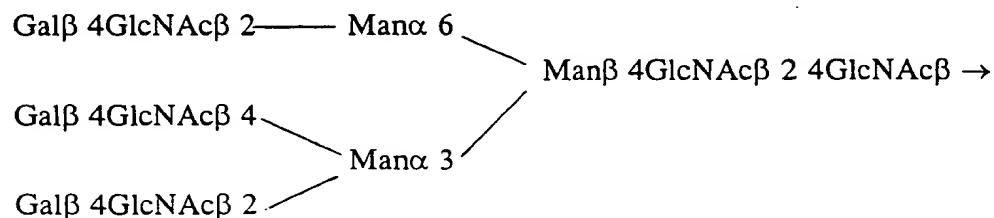
les fonctions NH_3^+ des susdits résidus pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance,

- le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre de radicaux R, représentant les ω -amino NH_3^+ , et de 0% à 45% des radicaux R pouvant être substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

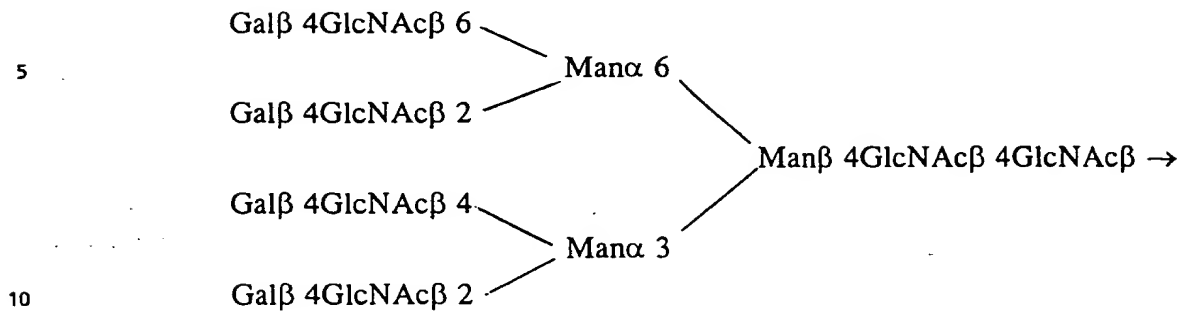
L'invention a également pour objet un complexe qui se caractérise en ce que le signal de reconnaissance est choisi parmi:

- A) - des osides simples ou complexes reconnus par des lectines membranaires, et choisis parmi:

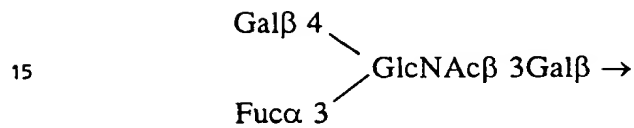
- a. Asialo-oligoside de type triantennaire lactosamine: récepteur d'asialoglycoprotéine



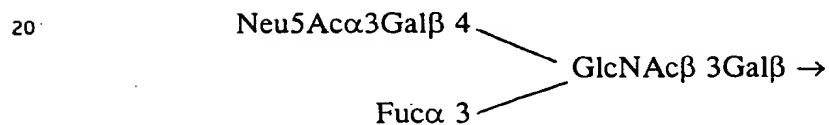
b. Asialo oligoside de type lactosamine tetraantennaire: récepteur d'asialoglycoprotéine



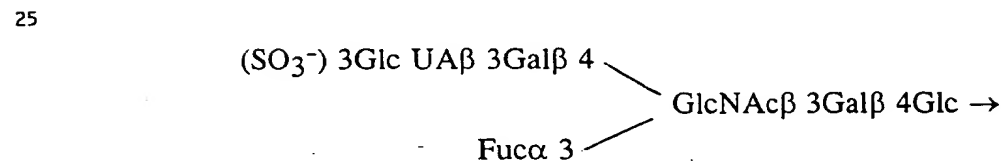
c. Lewis x: LECAM 2/3



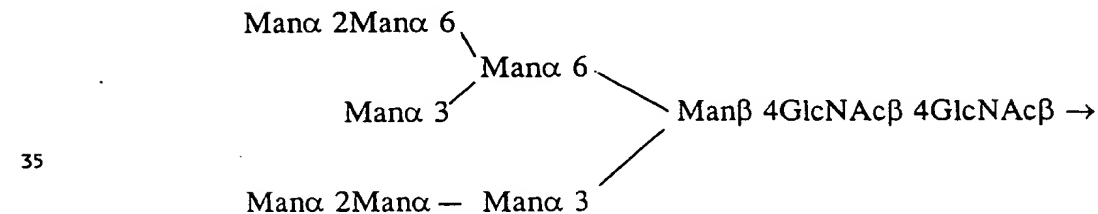
d. Lewis x sialyl: LECAM 3/2



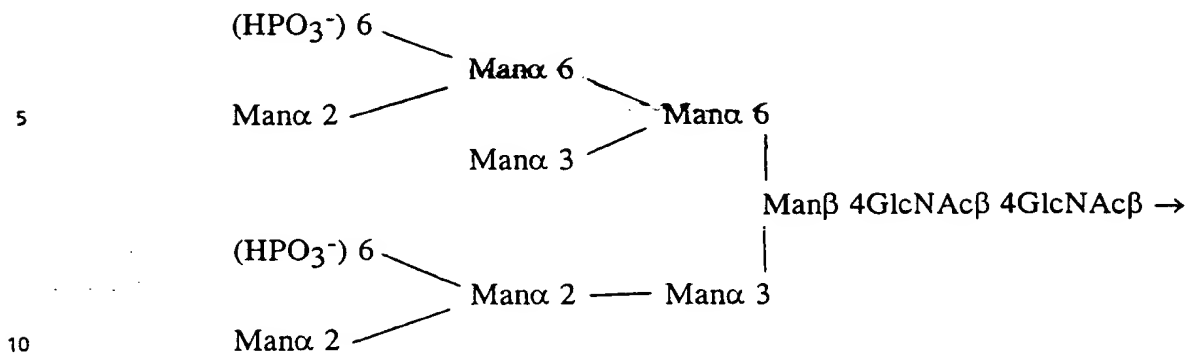
e. Dérivé de Lewis x sulfaté (HNK1): LECAM 1



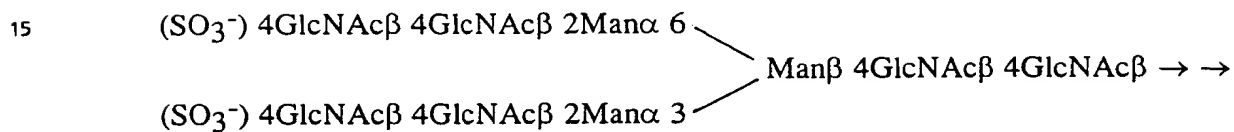
f. Oligomannoside: récepteur du mannose



g. Oligomannoside phosphorylé: récepteur de mannose 6 phosphate



h. Oligosaccharide de type lactosamine sulfaté: récepteur de GalNAc 4 sulfaté



B) des peptides

a. peptides anti-inflammatoires ou certains de leurs fragments reconnus par des récepteurs de la paroi vasculaire, tels que

- polypeptide vasodilatateur intestinal (VIP)

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH₂

- polypeptide atrial natriurétique (ANP)

SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY

- lipocortine

HDMNKVLDL

- bradykinine

RPPGFSPFR;

b. peptides ligands des intégrines, tels que les peptides contenant la séquence RGD, ligand de la fibronectine;

c. facteurs chimiotactiques, tels que les formyl peptides et leurs antagonistes:

FMLP, (N-formyl-Met-Leu-Phé);

d. hormones peptidiques tels que
l' α -MSH: Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH₂ et leurs antagonistes.

C) Métabolites naturels tels que:

- la biotine,
- la carnitine.
- le tétrahydrofolate et l'acide folique pouvant être à la fois un signal de reconnaissance vis-à-vis de certaines cellules possédant les récepteurs appropriés et un déstabilisateur des membranes cellulaires.

L'invention concerne également un complexe qui se caractérise en ce que l'acide nucléique peut être choisi parmi:

a) des gènes marqueurs, tels que

- gènes contenant la luciférase,
- protéine verte de la méduse *Aequorea victoria*,
- gènes contenant la β -galactosidase,
- gènes contenant la chloramphénicol acétyl transférase,
- gènes conférant la résistance à un antibiotique, tels que l'hygromycine, la néomycine etc...;

b) des gènes à visée thérapeutique, tels que

- récepteurs des lipoprotéines de faible densité, déficient dans les cas d'hypercholestérolémie,
- facteurs de coagulation: facteurs VIII et IX,
- phénylalanine-hydroxylase (phénylcétonurie),
- adénosine désaminase (immunodéficiences ADA),
- enzymes lysosomiques, telles que la β -glucosidase dans le cas de la maladie de Gaucher,
- dystrophine et minidistrophine (myopathie),
- tyrosine hydroxylase (Parkinson),
- facteurs de croissance des neurones (Alzheimer),
- CFTR cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator (mucoviscidose),
- alpha1-antitrypsine,
- cytokines (interleukines, TNF facteur de nécrose des tumeurs),
- thymidine kinase du virus Herpes simplex,
- protéines du MHC, système majeur d'histocompatibilité, en particulier les HLA-B7,
- cytosine désaminase,
- gènes codant pour des ARN sens et antisens,

- gènes codant pour des ribozymes,
- c) des gènes à visée vaccinale
 - gènes codant pour des antigènes viraux (vaccination), par exemple: gène codant pour la nucléoprotéine du virus de la grippe.

L'invention a également pour objet un complexe dans lequel:

- le polymère, notamment la polylysine présente un degré de polymérisation d'environ 15 à environ 900, de préférence 200,

- les fonctions NH_3^+ libres des motifs lysine étant substituées dans un rapport de 35% par des résidus histidyle et éventuellement par une molécule constituant un signal de reconnaissance pour 1 à 50 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité d'au moins 10^5 l mole^{-1} vis-à-vis du récepteur de la cellule que le complexe doit cibler ou éventuellement par 20 à 100 molécules de signal de reconnaissance pour 200 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité inférieure à 10^5 l mole^{-1} vis-à-vis du susdit récepteur,

- l'acide nucléique présente une masse moléculaire d'environ 10^6 à environ 10^8 , notamment de $3 \cdot 10^6$ à $30 \cdot 10^6$,

- le rapport entre le nombre moyen de paires de base de l'acide nucléique par molécule de motif de monomère, notamment la lysine est d'environ 0,2 à environ 6, de préférence d'environ 0,4 à environ 0,6.

S'agissant des affinités :

- pour une molécule signal de très haute affinité vis-à-vis de son récepteur ($K_a > 10^7 \text{ l/mole}$), d'environ 0, 5 à 5, avantageusement 1 molécule pour environ 10 000 motifs monomères de polymère substitué soit 1 molécule pour environ 50 molécules de polymère substitué;

- pour une molécule signal de haute affinité vis-à-vis de son récepteur (K_a entre 10^5 l/mole et 10^7 l/mole), d'environ 0, 5 à environ 10, avantageusement 1 molécule pour environ 200 motifs monomères de polymère substitué soit 1 molécule pour environ 1 molécule de polymère substitué;

- pour une molécule signal de moyenne affinité vis-à-vis de son récepteur ($K_a < 10^5 \text{ l/mole}$), d'environ 10 à environ 100, avantageusement 50 molécules pour environ 200 motifs monomères de polymère substitué soit 50 molécules pour environ 1 molécule de polymère substitué.

L'invention a également pour objet un conjugué polymérique chargé positivement, contenant des motifs portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ

45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose,

- 5 - les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :
 - . ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,
 - . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
 - 10 . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,
 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,
 - 15 - les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes :
 - . ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
 - . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
 - 20 . les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés pouvant être substitués par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
 - des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :
 - 25 . soit par substitution de certaines fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ des lysines),
 - . soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl), et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés, entraînant
 - 30 une diminution de charge,
 - . soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),
 - . soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes
 - 35 cellulaires (par exemple histidine),
- sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

L'invention concerne également un conjugué polymérique tel que défini ci-dessus ou contenant un groupement polymérique tel que défini ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le conjugué polymérique est choisi parmi la polylysine histidylée substituée par du lactose, la polylysine histidylée substituée par un oligoside complexe tel que Lewis^b, la polylysine histidylée substituée par le peptide ANP ou la polylysine histidylée substituée par de la biotine.

La préparation des conjugués polymériques de l'invention peut se faire selon l'une des façons décrites dans les tableaux suivants :

Tableau I : Méthodes de préparation des conjugués polymériques avec des signaux de reconnaissance fixés sur certains motifs monomériques du polymère.

On a indiqué par 1, 2, 3 l'ordre d'introduction respectif des résidus responsables de la déstabilisation, de ceux responsables de la diminution de charge et des signaux de reconnaissance sur le polymère.

méthode	POLYMÈRE		
	résidus		
	responsables de la déstabilisation	responsables de la diminution de charge	signal de reconnaissance
I	1	-	2
II	2	-	1
III	1	2	3
IV	1	3	2
V	2	1	3
VI	3	1	2
VII	2	3	1
VIII	3	2	1

Tableau II : Méthodes de préparation des conjugués polymériques avec des signaux de reconnaissance fixés sur certains résidus responsables de la déstabilisation des membranes.

On a indiqué par 1, 2, 3 l'ordre d'introduction respectif des résidus responsables de la déstabilisation, de ceux responsables de la diminution de

charge et des signaux de reconnaissance sur le polymère.

méthode	POLYMERE		
	résidus		
	responsables de la déstabilisation	responsables de la diminution de charge	signal de reconnaissance
IX	1	-	2
X	1	2	3
XI	1	3	2
XII	2	1	3

Tableau III : Méthodes de préparation des conjugués polymériques avec des signaux de reconnaissance fixés sur certains résidus responsables de la diminution de charge.

On a indiqué par 1, 2, 3 l'ordre d'introduction respectif des résidus responsables de la déstabilisation, de ceux responsables de la diminution de charge et des signaux de reconnaissance sur le polymère.

méthode	POLYMERE		
	résidus		
	responsables de la déstabilisation	responsables de la diminution de charge	signal de reconnaissance
XIII	2	1	3
XIV	3	1	2
XV	1	2	3

Les résidus responsables de la déstabilisation des membranes sont choisis parmi: histidine, 4-carboxyméthyl-imidazole, 3-(1-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 3-(1-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 2-carboxy-imidazole, histamine, acide 3-(imidazol-4yl)-L-lactique, 2-(1-méthyl-imidazol-4yl)-éthylamine, 2-(3-méthyl-imidazol-4yl)-éthylamine, β -alanyl-histidine, 7-chloro-4(amino-1-méthylbutylamino)-quinoline, N⁴-(7-chloro-4-quinoliny)-1,4-pentanediamine, 8-

(4-amino-1-méthylbutylamino)-6-méthoxy-quinoline, N⁴-(6-méthoxy-8-quinoliny)-1,4-pentanediamine, acide quininique, acide quinoline carboxylique, acide ptéroïque, acide nicotinique, acide quinolinique.

Les résidus responsables de la diminution de charge sont choisis parmi : dihydroxypropionyle, érythronoyale, thréonoyale, ribonoyale, arabinoyale, xylonoyale, lyxonoyale, gluconoyale, galactonoyales, mannonoyale, glycoheptonoyale, glycooctonoyale.

Les signaux de reconnaissance sont choisis parmi : des osides, des oligosides, des peptides, des métabolites, des agonistes, des antagonistes.

A titre d'exemple nous décrivons différentes méthodes des tableaux :

1) Les signaux de reconnaissance sont fixés sur certains motifs monomériques du polymère après l'introduction des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires de la façon suivante :

A) Méthode I

polylysine nicotinylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺ libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. Par exemple, la polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'acide nicotinique) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

b) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains groupements ε-aminés des résidus lysyles du polymère.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine nicotinylée, on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Des osides simples sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ε-aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871-878).

2) fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés

phénylisothiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohyd. Letters 1, 269-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminés des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21 : 871-878).

polylysine histidylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus comportant une fonction permettant la fixation ultérieure d'autres molécules telles que celles qui constitueront un signal de reconnaissance, par exemple, après réaction en milieu organique avec un ester N-hydroxysuccinimide de l'acide dithiopyridine propionate ou de ses dérivés.

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple, après réaction en milieu organique avec l'histidine dont le groupe αNH_3^+ et le groupe NH du noyau imidazole sont protégées par du tertibutyloxycarbonyl en présence d'un agent de couplage tel que l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium. Après réaction et purification, les fonctions aminées des résidus histidyles du polymère obtenu sont déprotégées.

c) Les signaux de reconnaissance sont liés aux groupements dithiopyridyles du polymère.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Les osides simples dérivés en glycopeptides avec une fonction dithiopyridyle (pyroglutamyl- $\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-S-S-pyridine}$) selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohyd. Letters 1:269-275) sont réduits et fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur les fonctions dithiopyridyles du polymère.

2) fixation d'oligosides

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis dérivés en glycopeptides avec une fonction dithiopyridyle (*pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine*) selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (*Brevet Français 9407738* (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275) sont réduits et fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur les fonctions dithiopyridyles du polymère.

B) Méthode III

polylysine nicotinylée et gluconoylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺ libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. Par exemple la polylysine gluconoylée est dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'acide nicotinique) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺ encore libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et d'un acide organique hydroxylé activé (notamment la δ -gluconolactone).

c) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains groupements ϵ -aminés des résidus lysyles du polymère.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Des osides simples sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871-878).

2) fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylthiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohyd. Letters 1:69-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylthiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21:871-878).

C) Méthode V

polylysine gluconoylée et histidylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus comportant une fonction permettant la fixation ultérieure d'autres molécules. S'agissant de la fixation de signaux de reconnaissance, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et de l'ester N-hydroxysuccinimide de l'acide dithiopyridine propionate ou de ses dérivés.

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ encore libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et d'un acide organique hydroxylé activé (notamment la δ -gluconolactone).

c) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ encore libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. S'agissant de la fixation de résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'histidine dont le groupe

αNH_3^+ et le groupe NH du noyau imidazole sont protégées par du tertibutyloxycarbonyl) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium). Après purification, les fonctions aminées protégées des résidus histidyle sont déprotégées.

d) Les signaux de reconnaissance sont liés aux groupements dithiopyridyles du polymère.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Les osides simples dérivés en glycopeptides avec une fonction dithiopyridyle (pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine) selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275) sont réduits et fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur les fonctions dithiopyridyles du polymère.

2) fixation d'oligosides

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis dérivés en glycopeptides avec une fonction dithiopyridyle (pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine) selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275) sont réduits et fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur les fonctions dithiopyridyles du polymère.

polylysine gluconoylée et nicotinylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺ encore libre sont partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et d'un acide organique hydroxylé activé (notamment la δ -gluconolactone).

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺

libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. Par exemple la polylysine gluconoylée est dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'acide nicotinique) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

c) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains groupements ϵ -aminés des résidus lysyles du polymère.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Des osides simples sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871-878).

2) fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylisothiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21:871-878).

II) Les signaux de reconnaissance sont fixés sur certains motifs monomériques du polymère avant l'introduction des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires de la façon suivante :

A) Méthode II polylysine nicotinylée

Ces substitutions suivent l'un quelconque des protocoles connus de l'homme de l'art.

a) A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) dissoute dans un

solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Des osides simples sous la forme de dérivés phénylthiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ε-aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, **21**: 871-878).

2) fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylthiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohyd. Letters 1, 269-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylthiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ε-aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, **21**:871-878).

b) S'agissant de la fixation des résidus entraînant la déstabilisation des membranes, par exemple la polylysine substituée par des osides ou des oligosides est dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'acide nicotinique) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

B) Méthode VI

polylysine gluconoylée et nicotinylée

Ces substitutions suivent l'un quelconque des protocoles connus de l'homme de l'art.

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺ encore libre sont partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la

diisopropyléthylamine) et d'un acide organique hydroxylé activé (notamment la δ -gluconolactone).

b) A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine gluconoylée dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), on indique ci-après la fixation d'osides ou d'oligosides.

1) fixation d'osides.

Des osides simples sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21: 871-878).

2) fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylisothiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés sur certaines fonctions ϵ -aminées des résidus lysyles libres de la polylysine comme précédemment décrit dans Midoux *et al.*, (Nucleic Acids Res. 1993, 21:871-878).

c) S'agissant de la fixation des résidus entraînant la déstabilisation des membranes, par exemple la polylysine substituée par des osides ou des oligosides est dissoute dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'acide nicotinique) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

III) les signaux de reconnaissance sont fixés sur certains résidus déstabilisants.

A) Méthode IX

polylysine histidylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. Par exemple, après réaction en milieu organique avec l'histidine dont le groupe NH_3^+ et le groupe NH du noyau imidazole sont

protégées par du tertiobutyloxycarbonyl en présence d'un agent de couplage tel que l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium. Après réaction et purification, les fonctions aminées des résidus histidyle du polymère obtenu sont déprotégées.

5 b) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains groupements NH_3^+ des résidus entraînant une déstabilisation des membranes.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'oligosides.

10 Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides de types triantennaire ou tétraantennaire ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylisothiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-
15 amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur certaines fonctions NH_2 des résidus histidyles. A ce pH, la fixation sur les NH_3^+ lysines est très faible, voire impossible.

B) Méthode XII

20 polylysine gluconoylée et histidylée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme
25 de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et d'un acide organique hydroxylé activé (notamment la δ -gluconolactone).

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+
30 encore libre sont ensuite partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. S'agissant de la fixation de résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base
35 (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment l'histidine dont le groupe αNH_3^+ et le groupe NH du noyau imidazole sont protégées par du tertiobutyloxycarbonyl) et d'un agent de couplage (notamment

l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium). Après purification, les fonctions aminées protégées des résidus histidyles sont déprotégées.

c) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains groupements NH_3^+ des résidus entraînant une déstabilisation des membranes.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine histidylée, on indique ci-après la fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis sont obtenus sous forme de dérivés phénylisothiocyanates de glycopeptides selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275). Les glycopeptides sous la forme de dérivés phénylisothiocyanates sont fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur certaines fonctions αNH_2 des résidus histidyles ; à ce pH, la fixation sur les NH_3^+ lysines est très faible, voire impossible.

C) Méthode IX

polylysine imidazolée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. S'agissant de la fixation de résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment le 4-carboxyméthyl-imidazole) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

b) Les signaux de reconnaissance sont liés sur certains noyaux imidazole des résidus entraînant une déstabilisation des membranes.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine imidazolée, on indique ci-après la fixation de peptides ou des glycopeptides.

Les résidus imidazole peuvent être facilement alkylés en milieu neutre par des composés possédant un groupement activé tel que par exemple, l'iodoacétamide ou ses dérivés ; ceci est connu depuis les travaux de Korman S. et Clarke H.T. en 1956 (J. Biol. Chem. 113:133). L'alkylation des imidazoles

par un dérivé de l'iodoacétamide s'effectue à pH voisin de la neutralité, 7,0 par exemple. A ce pH, les groupes ϵ -aminés de la lysine ne sont pas affectés, ils le seraient à pH beaucoup plus alcalin 9 ou au delà. Les signaux de reconnaissance de nature peptidique ou glycopeptidique (Monsigny *et al.*, Brevet Français 9407738. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications et Sdiqui *et al.*, 1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275) peuvent être facilement substitués par un groupement iodoacétamide. Les dérivés du type ICH_2CONHR : $\text{I-CH}_2\text{-CO-NH-peptide}$ ou $\text{I-CH}_2\text{-CO-NH-glycopeptide}$, sont fixés en milieu aqueux tamponné à pH neutre sur l'azote 3 et avec une efficacité moindre sur l'azote 1, conduisant à des dérivés *N*-carboxyméthyl stables. On peut également utiliser des dérivés du bromoacétamide qui sont également d'excellents réactifs pour alkyler des résidus imidazole (voir par exemple Henrikson *et al.*, 1965 J. Biol. Chem. 240:2921). Ce type de substitution, sous réserve de substituer un faible nombre de résidus imidazole par des signaux de reconnaissance ayant une haute affinité suffisante pour leur récepteur, ne fait pas perdre au polymère substitué par des résidus imidazole sa capacité destabilisatrice des membranes à pH légèrement acide.

IV) Les signaux de reconnaissance sont fixés sur certains résidus neutralisants.

A) Méthode XIII

polylysine gluconoylée et imidazolée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et par deux acides organiques hydroxylés activés (notamment la 6-désoxy-6-iodo- δ -gluconolactone pour une part et la δ -gluconolactone pour 10 à 50 parts).

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH_3^+ libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. S'agissant de la fixation de résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une

déstabilisation des membranes cellulaires (notamment le 4-carboxyméthyl-imidazole) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

c) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains des résidus
5 neutralisants.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine gluconoylée et histidylée, on indique ci-après la fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou
tétrantennés ou Lewis dérivés en glycopeptides avec une fonction
10 dithiopyridyle (pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine) selon une méthode
décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui,
N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur
procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New
synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275) sont
15 réduits par le triscarboxyéthylphosphine en milieu neutre (pH voisin de 7,0) par
exemple et fixés en milieu aqueux tamponné à pH légèrement alcalin (aux
environs de pH 8,5) sur les résidus 6-désoxy-6-iodo-gluconoyles du polymère.
Ce type de substitution, sous réserve de substituer un faible nombre de résidus
imidazole par des signaux de reconnaissance ayant une haute affinité pour leur
20 récepteur, ne fait pas perdre au polymère substitué par des résidus imidazole sa
capacité déstabilisatrice des membranes à pH légèrement acide.

B) Méthode XIII

polylysine gluconoylée et imidazolée

a) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺
25 libre sont partiellement substitués par des résidus non chargés entraînant une
diminution de charge. S'agissant de la fixation des résidus entraînant la
diminution de charge, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme
de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le
diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la
30 diisopropyléthylamine) et par deux acides organiques hydroxylés activés
(notamment la 6-bromoacétamido-L-gulono-1,5 lactone pour une part et la δ -
gluconolactone pour 10 à 50 parts). La 6-bromoacétamido-L-gulono-1,5 lactone
est obtenue après réduction par le cyanoborohydrure de l'imine obtenue en
mélangeant une solution ammoniacale (NH₄OH ou (NH₄)₂CO₃) et une solution
35 d'acide uronique, l'acide glucuronique par exemple, puis par acylation de
l'amine par un bromoacétate activé, par exemple l'anhydride bromoacétique ou
le bromo acétate de succinimidyle.

b) les motifs monomères du polymère comportant une fonction NH₃⁺

libre sont partiellement substitués par des résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires. S'agissant de la fixation de résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires, par exemple un sel de polylysine (notamment sous forme de *p*-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine), de molécules entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (notamment le 4-carboxyméthylimidazole) et d'un agent de couplage (notamment l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytrisdiméthylaminophosphonium).

c) Les signaux de reconnaissance sont liés à certains des résidus neutralisants.

A titre d'exemple de fixation des signaux de reconnaissance sur la polylysine gluconoylée et histidylée, on indique ci-après la fixation d'oligosides.

Les oligosides complexes tels que les asialo-oligosides bi-, tri- ou tétraantennés ou Lewis dérivés en glycopeptides avec une fonction dithiopyridyle (*pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine*) selon une méthode décrite dans Monsigny *et al.*, (Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. 1994 Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications) et Sdiqui *et al.*, (1995 New synthesis of glyco-amino acid conjugates. Carbohydr. Letters 1:269-275) sont réduits par le triscarboxyéthylphosphine en milieu neutre (pH voisin de 7,0) par exemple et fixés en milieu aqueux tamponné à pH légèrement alcalin (aux environs de pH 8,5) sur les résidus bromoacétamido gulonyle du polymère. Ce type de substitution, sous réserve de substituer un faible nombre de résidus imidazole par des signaux de reconnaissance ayant une haute affinité pour leur récepteur, ne fait pas perdre au polymère substitué par des résidus imidazole sa capacité déstabilisatrice des membranes à pH légèrement acide.

Le complexe acide nucléique/conjugué polymérique est obtenu en mélangeant une solution de l'acide nucléique concerné et une solution du conjugué polymérique. De préférence, lesdites solutions sont préparées à partir du sérum physiologique ou d'un tampon ou d'un milieu cytocompatible.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, on utilise un complexe tel que décrit ci-dessus ou un conjugué tel que décrit ci-dessus pour la transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* de cellules à l'aide d'un gène, notamment ceux définis précédemment.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, on utilise un complexe ou un conjugué tels que décrits ci-dessus, se caractérisant en ce que les cellules sont choisies parmi:

- des cellules souches hématopoïétiques;
- des cellules dendritiques;
- cellules du foie;
- cellules des muscles squelettiques;
- 5 - cellules de la peau:

- . fibroblastes,
- . kératinocytes,
- . cellules dendritiques,
- . mélanocytes.

- 10 - cellules des parois vasculaires;
- . endothéliales;
- . musculaires lisses;
- cellules épithéliales des voies aériennes;
- cellules du système nerveux central;

- 15 - cellules cancéreuses;
- cellules du système immunitaire, telles que des lymphocytes, des macrophages, des cellules NK etc...

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la méthode de transfection *in vitro* ou *ex vivo*, se caractérise en ce que l'on met en présence un

20 complexe tel que décrit précédemment dans un milieu contenant des cellules à transfecter, dans des conditions telles qu'il y a:

- passage du complexe à partir du milieu dans le cytoplasme des cellules,
- relargage de l'acide nucléique impliqué dans le susdit complexe dans
- 25 le cytosol et/ou le noyau des cellules,
- transcription et expression de l'acide nucléique dans les cellules transfectées,
- expression de la protéine correspondant au gène transfecté.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique, qui se

30 caractérise en ce qu'elle comprend à titre de substance active, l'un au moins des complexes tels que décrits ci-dessus, ou l'un au moins des conjugués tels que décrits ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, on utilise un

35 complexe tel que décrit ci-dessus ou un conjugué tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné par exemple au traitement de déficience métabolique congénitale ou acquise, ou au traitement de tumeurs, ou pour la préparation d'un vaccin, par exemple vaccin contre la grippe.

L'invention a également pour objet une trousse ou un kit comprenant:

- un conjugué polymérique tel que décrit ci-dessus, tel que la polylysine, substituée par un résidu entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, ce conjugué polymérique étant apte à comporter éventuellement un signal de reconnaissance, lequel est préalablement fixé ou non sur le susdit conjugué polymérique, ledit signal de reconnaissance étant fonction de la cellule à cibler,

- éventuellement un plasmide contenant au moins un gène à transférer, et éventuellement le système de régulation de l'expression du susdit gène,

- des réactifs permettant la fixation éventuelle du signal de reconnaissance sur le susdit conjugué polymérique,

- des réactifs permettant la formation d'un complexe tel que décrit ci-dessus, ou entre le conjugué polymérique et le gène à transférer, ou entre le conjugué polymérique et un plasmide contenant le gène à transférer,

- des réactifs permettant la transfection de la cellule par le susdit complexe.

DESCRIPTION DES FIGURES :

Figure 1

Elle représente un fragment de polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle.

Figure 2

Elle représente le spectre RMN à 300 MHz dans D₂O de la polylysine (DP 190) substituée par 70 résidus histidyle :

1,28 à 1,88 ppm : 6 protons des carbones 3, 4 et 5 des lysines substituées ou non substituées:

2,39 ppm : protons du groupe CH₃ du *p*-toluène sulfonate

2,75 ppm : trace de DMSO

2,99 ppm : 2 protons du carbone 6 d'un résidu lysyle non substitué

3,15 ppm : 2 protons du carbone 6 d'un résidu lysyle substitué

3,35 ppm : 2 protons du carbone 9 d'un résidu histidyle

4,36 ppm : 2 protons des carbones 2 et 8

4,78 ppm : pic de l'eau

7,36 ppm : 2 protons (doublet, constante de couplage en ortho = 7,97 Hz) des protons des carbones 2 et 6 du cycle aromatique du *p*-toluène sulfonate

7,42 ppm : 1 proton du carbone 11 d'un résidu histidyle

7,71 ppm : 2 protons (doublet, constante de couplage en ortho = 8,01 Hz)
des protons des carbones 3 et 5 du cycle aromatique du *p*-toluène sulfonate

8,7 ppm : 1 proton du carbone 12 d'un résidu histidyle.

Figure 3

Elle concerne la préparation de la polylysine (DP 190) partiellement substituée par 70 résidus histidyle.

La poly-L-lysine sous forme bromhydrate (masse moléculaire moyenne 40 000 ; degré de polymérisation moyen 190) (1 g dans 200 ml H₂O) provenant de chez Bachem Feinchemikalien (Budendorf, Suisse) est d'abord passée sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 2 x 8, forme OH⁻ ; 35 x 2,5 cm) dans le but d'enlever le bromure qui est toxique pour les cellules. La solution de polylysine est neutralisée avec une solution d'acide *p*-toluène sulfonique à 10% dans l'eau puis lyophilisée.

La polylysine est partiellement substituée avec des résidus histidyle comme suit : la polylysine sous forme *p*-toluène sulfonate (50 mg ; 0,96 μmoles) dissoute dans 3 ml de DMSO (diméthylsulfoxyde) en présence de diisopropyléthylamine (42 μl ; 288 μmoles), est mise à réagir pendant 24 heures à 20°C avec 32 mg de (Boc)His(Boc)-OH (96 μmoles) en présence de 43 mg d'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylaminophosphonium (BOP) (97 μmoles). Les résidus histidyle sont ensuite déprotégés en présence de 20 ml d'un mélange eau et acide trifluoroacétique (TFA) (50/50 V/V) pendant 24 heures à 20°C. L'eau et le TFA sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Le polymère est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau distillée et la solution est lyophilisée. Le nombre *x* de résidus histidyle fixé par molécule de polylysine est déterminé par RMN du proton comme suit :

$$x = h_{8.7} / h_{Lys} \times DP / 6$$

où *h*_{8.7} est l'intégrale du pic à 8,7 ppm correspondant au proton du carbone 12 d'un résidu histidyle, *h*_{Lys} est l'intégrale des pics entre 1,28 et 1,88 ppm correspondant aux 6 protons des carbones 3, 4 et 5 des résidus lysine et DP est le degré de polymérisation de la polylysine (DP = 190). Le nombre de résidus histidyle fixé par molécule de polylysine est *x*, *x* = 70 dans la préparation décrite ci-dessus.

Figure 4

Elle représente le transfert de gènes dans les cellules HepG2 en utilisant la polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle (HisPLK).

Les complexes ADN/HispLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μ g dans 0, 7 ml de DMEM) et la polylysine substituée par 70 résidus histidyle (40 μ g dans 0, 3 ml de DMEM). Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée avec 5% de sérum bovin foetal. Les complexes ADN/pLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μ g dans 0, 7 ml de DMEM) et la polylysine (5 μ g dans 0, 3 ml de DMEM). Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée avec 5% de sérum bovin foetal et éventuellement avec 100 μ M de chloroquine (+ chloro) ou 20 μ M d'un peptide fusiogène (+ E5CA) (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCA). Le milieu dans lequel les cellules HepG2 (3×10^5 cellules/4 cm²) ont poussé pendant 24 heures, est éliminé et remplacé par une solution (1 ml) contenant un complexe ADN/polymère (5 μ g/ml d'ADN). Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant, pendant 4 secondes la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de la lumière émise exprimées en unités arbitraires) dans les lysats cellulaires.

Dans ces conditions, 1 pg/ml de luciférase produit 2000 RLU.

En allant de gauche à droite sur l'axe des abscisses, le premier rectangle correspond au complexe ADN/polylysine histidylée, le deuxième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine, le troisième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine additionné de chloroquine, le quatrième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine additionné du peptide fusiogène E5CA.

Figure 5

Elle concerne le transfert de gènes dans les cellules HepG2 en utilisant la polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle. Elle représente l'influence du nombre de résidus histidyle fixé par molécule de polylysine sur l'efficacité de la transfection.

En allant de gauche à droite sur l'axe des abscisses, le premier rectangle correspond au complexe ADN/polylysine non substitué, le deuxième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine substitué par 30 résidus d'histidyle, le troisième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine substitué par 63 résidus d'histidyle, le quatrième rectangle correspond au complexe ADN/polylysine substitué par 70 résidus d'histidyle, le cinquième rectangle

correspond au complexe ADN/polylysine substitué par 84 résidus d'histidyle.

Les complexes ADN/HisPLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μg dans 0,7 ml de DMEM) et la polylysine substituée par un nombre variable de résidus histidyle (40 μg dans 0,3 ml de DMEM). Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée avec du sérum bovin foetal (concentration finale 10%). Le milieu dans lequel les cellules HepG2 (3×10^5 cellules/4 cm^2) ont poussé pendant 24 heures, est éliminé et remplacé par une solution (1 ml) contenant un complexe ADN/polymère (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN). Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant, pendant 4 secondes, la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de la lumière émise exprimées en unités arbitraires) dans les lysats cellulaires.

Dans ces conditions, 1 pg/ml de luciférase produit 2000 RLU.

Figure 6

Elle concerne le transfert de gènes dans les cellules HOS en utilisant la polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle. Elle représente l'influence sur l'efficacité de la transfection du rapport ADN/polymère (exprimé sur les abscisses en μg de polymère pour 10 μg d'ADN) dans les complexes pCMVLUC/His₈₄pLK.

Les complexes ADN/HisPLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μg dans 0,7 ml de DMEM) et différentes quantités de polylysine substituée par 84 résidus histidyle dans 0,3 ml de DMEM. Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée avec 1% de sérum bovin foetal. Le milieu dans lequel les cellules HOS (2×10^5 cellules/4 cm^2) ont poussé pendant 24 heures est éliminé et remplacé par une solution (1 ml) contenant un complexe ADN/polymère (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN). Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant pendant 4 secondes la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de la lumière émise exprimées en unités arbitraires) dans les lysats cellulaires.

Dans ces conditions, 1 pg/ml de luciférase produit 2000 RLU.

Figure 7

Elle concerne le transfert de gènes dans les cellules HepG2 en utilisant la polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle. Elle représente l'influence du temps d'incubation (exprimé en heures sur les abscisses) des complexes pCMVLUC/His70pLK avec les cellules sur l'efficacité de la transfection. Les complexes ADN/HispLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μ g dans 0, 7 ml de DMEM) et la polylysine substituée par 70 résidus histidyle (40 μ g dans 0, 3 ml de DMEM). Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée à 10% avec du sérum bovin foetal. Le milieu dans lequel les cellules HepG2 (3×10^5 cellules/4 cm²) ont poussé pendant 24 heures est éliminé et remplacé par une solution (1 ml) contenant un complexe ADN/polymère (5 μ g/ml d'ADN). Après les différents temps d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant, pendant 4 secondes la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de la lumière émise exprimées en unités arbitraires) dans les lysats cellulaires.

Dans ces conditions, 1 pg/ml de luciférase produit 2000 RLU.

Figure 8

Elle concerne le transfert de gènes dans les cellules HepG2 en utilisant la polylysine (DP 190) partiellement substituée par des résidus histidyle. Elle représente l'influence sur l'efficacité de la transfection de la quantité de sérum bovin foetal (exprimé sur l'axe des abscisses en % de sérum dans le milieu utilisé) présent pendant l'incubation des complexes pCMVLUC/His70pLK avec les cellules. Les complexes ADN/HispLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μ g dans 0, 7 ml de DMEM) et la polylysine substituée par 70 résidus histidyle (40 μ g dans 0, 3 ml de DMEM). Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée avec différentes quantité de sérum bovin foetal. Le milieu dans lequel les cellules HepG2 (3×10^5 cellules/4 cm²) ont poussé pendant 24 heures, est éliminé et remplacé par une solution (1 ml) contenant un complexe ADN/polymère (5 μ g/ml d'ADN). Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant, pendant 4 secondes la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de

la lumière émise exprimées en unités arbitraires) dans les lysats cellulaires.

Dans ces conditions, 1 pg/ml de luciférase produit 2000 RLU.

Tableau 4

Cellules	RLU x $10^{-6}/10^6$ cellules
HepG2	12
B16	3
HOS	1.9
MCF-7	2.4
COS	0.4
Rb1	15

Il concerne le transfert de gènes dans différentes lignées cellulaires en utilisant la polylysine (DP 190) substituée par 84 résidus histidyle. Les complexes ADN/HisPLK sont formés en mélangeant le plasmide pCMVLUC (10 μ g dans 0, 7 ml de DMEM) et de la polylysine substituée par 84 résidus histidyle dans 0, 3 ml de DMEM. Après 30 minutes à 20°C, la solution contenant les complexes est diluée une fois avec du DMEM et complétée à 10% avec du sérum bovin foetal. Le milieu dans lequel les cellules ($2-3 \times 10^5$ cellules/4 cm²) ont poussé pendant 24 heures, est éliminé et remplacé par une solution contenant un complexe ADN/polymère (5 μ g/ml d'ADN). Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu des cellules est de nouveau éliminé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture en présence de 10% de sérum bovin foetal. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures après la transfection, en mesurant, pendant 4 secondes la luminescence émise (RLU : valeurs relatives de la lumière émise exprimées en unités arbitraires) dans les lysats cellulaires. HepG2 = lignée de cellules dérivant d'un hépatocarcinome humain ; HOS = lignée de cellules dérivant d'un ostéosarcome humain ; MCF-7 ; lignée de cellules dérivant d'un adénocarcinome humain ; B16 = lignée de cellules dérivant d'un mélanome murin ; COS = lignée de cellules dérivant de cellules de reins de singe transformées par SV40 ; Rb1 = lignée de cellules dérivant de cellules musculaires lisses d'aorte de lapin.

Préparation de la polylysine histidylée substituée par le lactose

- préparation de la polylysine substituée par des groupements thiol activés

La polylysine sous forme hydrobromide (masse moléculaire moyenne
 40 000 ; degré de polymérisation moyen 190) (1 g dans 200 ml H₂O) provenant
 de chez Bachem Feinchemikalien (Budendorf, Suisse) est d'abord passée sur une
 colonne échangeuse d'anions (Dowex 2 x 8, forme OH⁻ ; 35 x 2,5 cm) dans le
 but d'enlever le bromure qui est toxique pour les cellules. La solution de
 polylysine est neutralisée avec une solution d'acide *p*-toluène sulfonique à 10 %
 dans l'eau puis lyophilisée.

La polylysine *p*-toluène sulfonate (50 mg ; 0,91 μ mol) est dissoute dans
 2 ml de DMSO et mise à réagir à 20°C pendant 12 h avec l'ester
 N-hydroxysuccinimide du 4-carbonyl- α -méthyl- α -(2-pyridinyldithio) toluène
 (SMPT, Pierce, USA) (5,3 mg ; 13,6 μ mol). La polylysine substituée par des
 groupes carbonyl α -méthyl- α -(2-pyridinyldithio)toluène (=MPT-pLK) est
 précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x
 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une
 nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau distillée et la solution est
 lyophilisée. Le nombre moyen de molécules de MPT lié par molécule de
 polylysine est déterminé par absorbance à 343 nm de la pyridine thione (ϵ =
 8080 M⁻¹ x cm⁻¹) libérée par réduction quantitative de la liaison disulfure à
 l'aide de (TCEP : tris-carboxyéthylphosphine) : le nombre moyen de MPT par
 molécule de polylysine est 10.

- préparation de la polylysine histidylée substituée par des groupements thiol activés.

La polylysine sous forme *p*-toluène sulfonate substituée par 10 résidus
 MPT (50 mg ; 0,96 μ moles) dissoute dans 3 ml de DMSO (dimethylsulfoxyde)
 en présence de diisopropyléthylamine (42 μ l ; 288 μ moles), est mise à réagir
 pendant 24 heures à 20°C avec 32 mg de (Boc)His(Boc)-OH (80 μ moles) en
 présence de 43 mg d'hexafluorophosphate de benzotriazolyl
 N-oxytris-diméthylaminophosphonium (BOP) (97 μ moles). Les résidus histidyle
 sont ensuite déprotégés en présence de 20 ml d'un mélange eau et acide
 trifluoroacétique (TFA)(50/50 V/V) à 50% pendant 24 heures à 20°C. L'eau et
 le TFA sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Le polymère est
 précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x
 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une
 nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau distillée et la solution est
 lyophilisée. Le nombre de résidus histidyle fixé par molécule de polylysine,

déterminé par RMN du proton est 60.

- réduction du dithiopyridyle

L'oligoside est d'abord transformé en glycopeptide selon une méthode décrite dans la demande de Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. (1994) Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications).

Le glycopeptide est fixé sur la polylysine partiellement histidylée via un pont disulfure.

Le Gal β 4Glc β -pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine (3 μ mol) est traité par 3,5 μ mole de TCEP (tris-carboxyéthylphosphine) dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7 (1 ml), pendant 1 h à 20°C. Cette solution est ajoutée à la polylysine partiellement histidylée substituée par 10 résidus MPT (10 mg ; 0,2 μ moles) dissoute dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7 (1 ml). Après 1 h à 20°C, le polymère est précipité par addition de 10 volumes d'isopropanol. Le précipité est récupéré après centrifugation (1 800 g, 15 min) et lavé dans l'isopropanol puis dissous dans l'eau et lyophilisé.

Le rendement de la réaction de couplage dans les conditions utilisées est égal ou supérieur à 90%.

Préparation de la polylysine histidylée et substituée par un oligoside complexe : le Lewis^b

Exemple du Lewis^b = Fuca α 4(Fuca α 2Gal β 3)GlcNAc β 3Gal β 4Glc

Les oligosides complexes ayant un résidu glucose (Glc) ou N-acétyl glucosamine (GlcNAc) en position réductrice sont d'abord transformés en glycopeptides selon une méthode décrite dans la demande de Brevet Français 9407738 (Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. (1994) Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications).

Les oligosides complexes sont fixés sur la polylysine partiellement histidylée selon une liaison du glycopeptide à la polylysine histidylée via un pont disulfure.

L'oligoside Fuca α 4(Fuca α 2Gal β 3)GlcNAc β 3Gal β 4Glc est dérivé en glycopeptide Fuca α 4(Fuca α 2Gal β 3)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β -pyroglutamyl-R. Le groupe carboxylique du pyroglutamyne est substitué par une fonction dithiopyridine pour donner le glycopeptide : Fuca α 4(Fuca α 2Gal β 3)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β -pyroglutamyl-NH-(CH₂)₂-S-S-pyridine (demande de Brevet Français 9407738 : Monsigny, M., Sdiqui, N., Roche, A.C. and Mayer, R. (1994) Nouveaux dérivés d'oligosides, leur procédé de préparation et leurs applications

et Quétard *et al.*, Simple synthesis of novel glycosynthons for glycoconjugate preparation : oligosylpyroglutamyl derivatives, en préparation).

-réduction du glycopeptide

Le glycopeptide (2 μmol) est traité par 2,2 μmole de TCEP (tris-carboxyéthylphosphine) dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7 (1 ml), pendant 1 h à 20°C. Cette solution est ajoutée à la polylysine partiellement histidylée substituée par 10 résidus MPT (10 mg ; 0,2 μmoles) dissoute dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7 (1 ml). Après 1 h à 20°C, le polymère est précipité par addition de 10 volumes d'isopropanol. Le précipité est récupéré après centrifugation (1 800 g, 15 min) et lavé dans l'isopropanol puis dissous dans l'eau et lyophilisé.

Le rendement de la réaction de couplage dans les conditions utilisées est égal ou supérieur à 90%.

Préparation de la polylysine histidylée substituée par le peptide ANP

- préparation de la polylysine substituée par des groupements thiol activés

La polylysine sous forme bromhydrate (masse moléculaire moyenne 40 000 ; degré de polymérisation moyen 190) (1 g dans 200 ml H_2O) provenant de chez Bachem Feinchemikalien (Budendorf, Suisse) est d'abord passée sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 2 x 8, forme OH^- ; 35 x 2,5 cm) dans le but d'enlever le bromure qui est toxique pour les cellules. La solution de polylysine est neutralisée avec une solution d'acide *p*-toluène sulfonique à 10% dans l'eau puis lyophilisée.

La polylysine *p*-toluène sulfonate (50 mg ; 0,91 μmol) est dissous dans 2 ml de DMSO et mise à réagir à 20°C pendant 12 h avec l'ester N-hydroxysuccinimide du 4-carbonyl- α -methyl- α -(2-pyridinyldithio) toluène (SMPT, Pierce, USA) (5,3 mg ; 13,6 μmol). Le polymère (MPT-pLK) est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau distillée et la solution est lyophilisée. Le nombre moyen de molécules de MPT lié par molécule de polylysine est déterminé par absorbance à 343 nm de la pyridine thione ($\epsilon = 8080 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) libérée par réduction quantitative de la liaison disulfure à l'aide de (TCEP) : le nombre moyen de MPT est 10.

- préparation de la polylysine histidylée substituée par des groupements thiol activés.

La polylysine sous forme *p*-toluène sulfonate substituée par 10 résidus MPT (50 mg ; 0,96 μmoles) dissoute dans 3 ml de DMSO (diméthylsulfoxyde)

en présence de diisopropyléthylamine (42 μ l ; 288 μ moles), est mise à réagir pendant 24 heures à 20°C avec 32 mg de (Boc)His(Boc)-OH (80 μ moles) en présence de 43 mg d'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylaminophosphonium (BOP) (97 μ moles). Les résidus histidyle sont ensuite déprotégés en présence de 20 ml d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 50% pendant 48 heures à 20°C. L'eau et le TFA sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Le polymère est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau distillée et la solution est lyophilisée. Le nombre x de résidus histidyle fixé par molécule de polylysine, déterminé par RMN du proton est 60.

- réduction du peptide ANP

Le peptide ANP (CYSLRRSSAFGGRIDRIGAQSA) ayant sa cystéine en position N-terminale protégée sous forme thiopyridinyle (7,5 mg ; 2 μ mol) est mis à réagir à 20°C pendant 15 minutes avec du TCEP (0,7 mg ; 2 μ mol) dans 1 ml de tampon 0,1 M NaCl, 0,1 M tris/HCl pH 7,6.

- préparation de la polylysine histidylée substituée avec le peptide ANP

La polylysine partiellement histidylée substituée par 10 molécules de MPT (MPT₁₀-His₇₀pLK) (10 mg ; 0,2 μ mol) dans 1 ml de tampon 0,1 M NaCl, 0,1 M tris/HCl pH 7,6 est mise à réagir à 20°C pendant 24 heures avec 7,5 mg (2 μ mol) de peptide ANP dont la cystéine a été réduite. Le polymère (ANP-S-, His₇₀-pLK) est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 minutes), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau distillée et la solution est lyophilisée. Le nombre moyen de molécules de peptide ANP fixé par molécule de polymère est déterminé par l'analyse des acides aminés du polymère par chromatographie à haute pression (HPLC) avec une colonne C₁₈ (Supelcosil LC-18-DB, Supelco, Bellefonte, PA, USA) en phase inverse, après hydrolyse du polymère dans HCl 5,6 N à 105°C pendant 72 heures et transformation des acides aminés libérés en dérivés phenylthiohydantoïne (PTH-aa). Le nombre moyen d'ANP par molécule de polymère est 8.

Préparation de la polylysine histidylée substituée par la biotine

La polylysine substituée par 60 résidus histidyles (15 mg ; 0,28 μ mol) dissoute dans 1 ml de DMSO en présence de DIEA (4 μ l ; 28 μ mol) est mise à

réagir pendant 7 h à 20°C avec l'ester N-hydroxysuccinimide du 6-(biotinamido)hexanoate (NHS-LC-biotine, Pierce, USA). Le polymère est précipité par addition de 10 volumes d'isopropanol. Le précipité est récupéré après centrifugation (1 800 g, 15 min) et lavé dans l'isopropanol puis dissous dans l'eau et lyophilisé.

REVENDEICATIONS

1. Complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose, et/ou des endosomes,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique au cours de la dissociation du complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

- . soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),

- . soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyles), notamment par les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés,

. soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),

. soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

2. Complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose et/ou des endosomes,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

. ce sont des bases dont le pK en milieu aqueux est inférieur à 8, de sorte qu'une proportion supérieure à 50% de ces bases liée à un polymère cationique ne soit pas protonée en milieu neutre de pH 7,4,

. ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

. ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

. ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique au cours de la dissociation du complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

- . soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),
- . soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl), et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge,
- . soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),
- . soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

3. Complexe entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus protonables en milieu faiblement acide entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules d'endocytose,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ils appartiennent à la famille des composés comportant un noyau imidazole,
- . ils appartiennent à la famille des quinolines,
- . ils appartiennent à la famille des ptérines,
- . ils appartiennent à la famille des pyridines,
- . les susdits résidus comportent un groupe fonctionnel leur

permettant d'être fixés au susdit polymère,
 . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,
 . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu
 par un récepteur membranaire cellulaire,

5 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être
 également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de
 reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, et/ou par des
 résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport
 au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide
 10 nucléique au cours de la dissociation du complexe, sous réserve que l'ensemble
 des susdits résidus contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres,

 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être
 également substituées par au moins une molécule constituant un signal de
 reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, et/ou par des
 15 résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport
 au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide
 nucléique par la dissociation du complexe,

 - les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés
 suivantes :

20 . ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
 . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu
 par un récepteur membranaire cellulaire,

 - des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un
 récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

25 . soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des
 susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de la lysine),

 . soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une
 diminution de charge (par exemple gluconoyl) et notamment sur les
 groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés entraînant une
 30 diminution de charge,

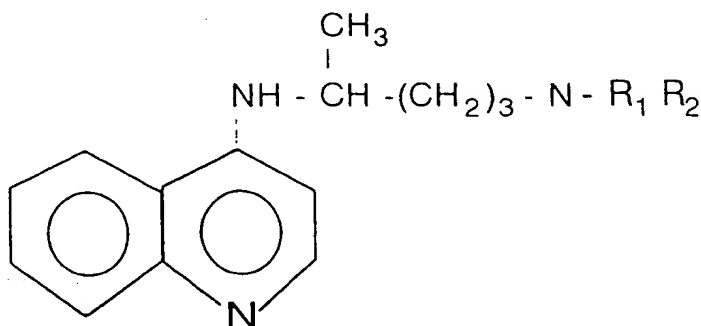
 . soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation
 des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),

 . soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des
 susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes
 35 cellulaires (par exemple histidine),

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du
 nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué
 polymérique.

4. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel les résidus entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires sont

- des alkylimidazoles dans lequel le radical alkyle comporte de 1 à 10, notamment de 2 à 6 atomes de carbone, et dans lequel un seul des atomes d'azote du noyau imidazole est substitué,
- ou des quinolines de formule :



dans laquelle R_1 représente H et R_2 représente $(CH_2)_n-CO_2-H$, n étant un nombre entier variant de 1 à 10, et de préférence valant de 1 à 3.

5. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel les résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires sont choisis parmi : histidine, 4-carboxyméthyl-imidazole, 3-(1-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 3-(3-méthyl-imidazol-4yl)-alanine, 2-carboxy-imidazole, histamine, acide 3-(imidazol-4yl)-L-lactique, 2-(1-méthyl-imidazol-4yl)éthylamine, 2-(3-méthyl-imidazol-4yl)éthylamine, β -alanyl-histidine-(carnosine), 7-chloro-4(amino-1-méthylbutylamino)-quinoline, N^4 -(7-chloro-4-quinoliny)-1,4-pentanediamine, 8-(4-amino-1-méthylbutylamino)-6-méthoxy-quinoline (primaquine), N^4 -(6-méthoxy-8-quinoliny)-1,4-pentanediamine, acide quininique, acide quinoline carboxylique, acide ptéroïque, acide nicotinique, acide quinolinique, et dans lequel

- la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus (par exemple histidine) peut être également substituée par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

6. Complexe selon l'une des revendications 1 à 5, entre au moins un acide nucléique (chargé négativement) et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine ou d'ornithine, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, par des résidus entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires,

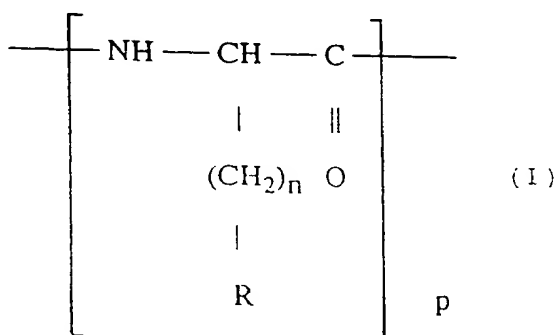
- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

- . ils comportent un noyau imidazole,
- . ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,
- . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance,

- les fonctions NH_3^+ libres restantes des susdits motifs monomères étant également substituées à raison d'environ 1% à environ 60% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant une masse moléculaire inférieure à 5000, ce signal de reconnaissance pouvant être présent à raison d'une molécule pour environ 200 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 200 motifs du conjugué polymérique,

sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

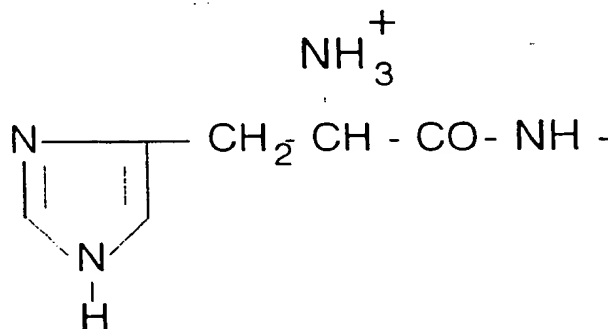
7. Complexe selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel le polymère contient un groupement polymérique de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- p est un nombre entier variant de 15 à 900, de préférence de 100 à 300,
- n est un nombre entier variant de 1 à 6, et vaut de préférence 4,
- ce groupement polymérique contient des radicaux R parmi lesquels :

10% à 45% du nombre de radicaux R représentant un résidu comportant un noyau imidazole et éventuellement une fonction NH_3^+ libre, notamment un résidu histidyle, R pouvant être représenté par la formule :

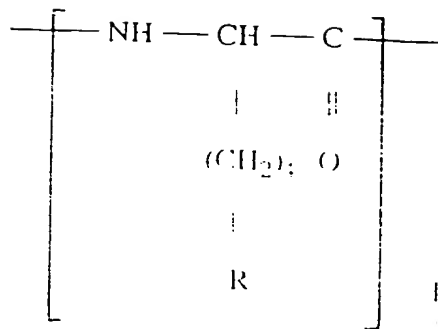


la fonction NH_3^+ éventuelle des susdits résidus pouvant être également substituée par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance,

10% à 90% du nombre de radicaux R, représentant les ω -amino NH_3^+ libres, et étant éventuellement substitué à raison de 0 à 50% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, notamment à raison de 0 à 60, avantageusement de 1 molécule pour environ 200 motifs, ou à raison de 2 à 100, avantageusement de 50 molécules pour environ 200 motifs, et/ou

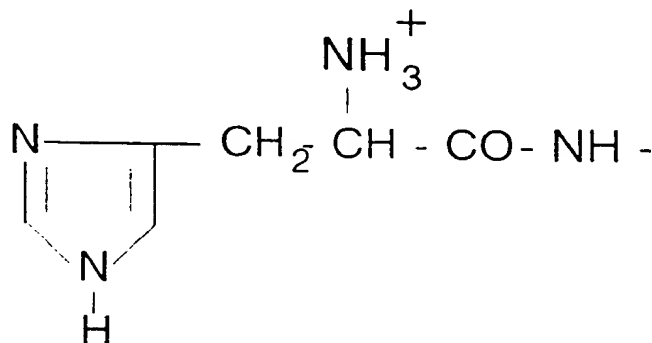
R pouvant en outre être constitué de 0 à 45% par un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, notamment un reste dihydroxypropionoylamido, érythronoylamido, thréonoylamido, ribonoylamido, arabinoylamido, xylonoylamido, lyxonoylamido, gluconoylamido, galactonoylamido, mannionoylamido, glycoheptonoylamido, glycooctonoylamido, m est un nombre entier de 2 à 15, de préférence de 2 à 7, R_1 représente H ou un radical alcoyle de 1 à 15 atomes de carbone, notamment CH_3 , ces radicaux pouvant être substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

8. Complexe selon la revendication 4, dans lequel le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II) suivante :



dans laquelle :

- p a les significations indiquées dans la revendication 4,
- 10% à 45% du nombre de radicaux R représentent un résidu comportant un noyau imidazole et éventuellement une fonction NH_3^+ libre, notamment un résidu histidyle, R pouvant être représenté par la formule



les fonctions NH_3^+ des susdits résidus pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance,

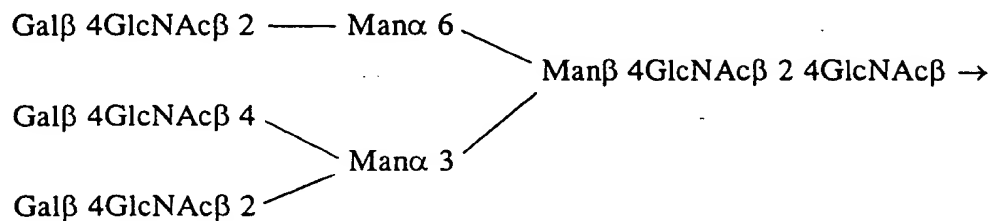
- le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre de radicaux R, représentant les ω -amino NH_3^+ , et de 0% à 45% des radicaux R pouvant être substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
- sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre de motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

9. Complexe selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le

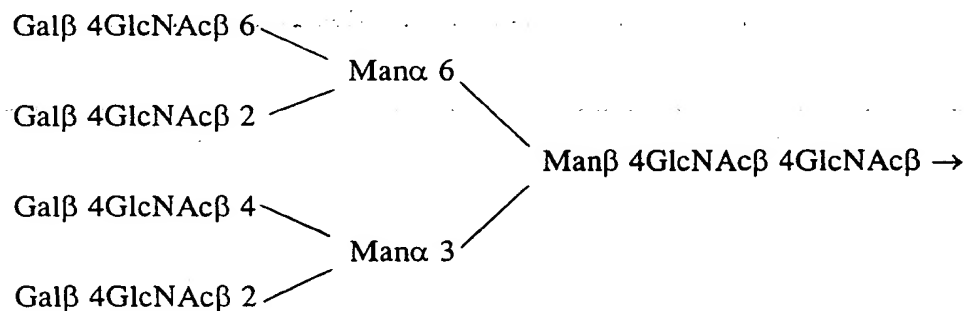
signal de reconnaissance est choisi parmi:

A) - des osides simples ou complexes reconnus par des lectines membranaires, et choisis parmi:

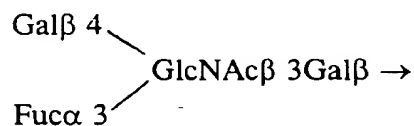
a. Asialo-oligoside de type triantennaire lactosamine: récepteur d'asialoglycoprotéine



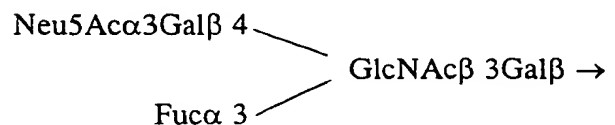
b. Asialo oligoside de type lactosamine tetraantennaire: récepteur d'asialoglycoprotéine



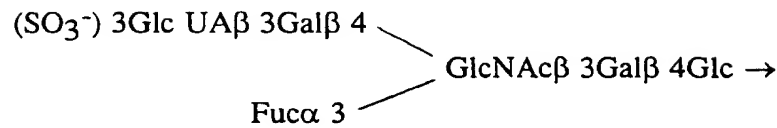
c. Lewis x: LECAM 2/3



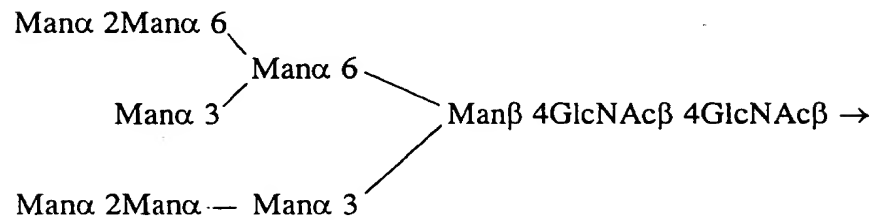
d. Lewis x sialyl: LECAM 3/2



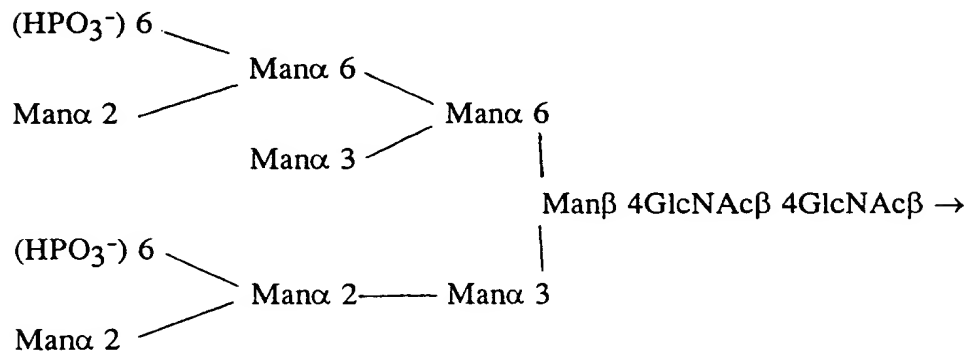
e. Dérivé de Lewis x sulfaté (HNK1): LECAM 1



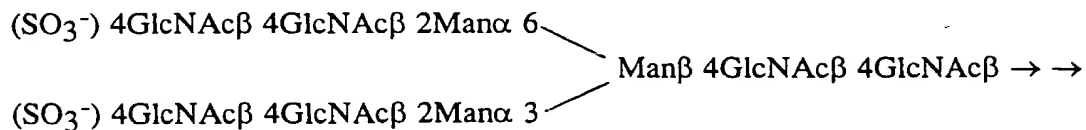
f. Oligomannoside: récepteur du mannose



g. Oligomannoside phosphorylé: récepteur de mannose 6 phosphate



h. Oligosaccharide de type lactosamine sulfaté: récepteur de GalNAc 4 sulfaté



B) des peptides

a) peptides anti-inflammatoires ou certains de leurs fragments reconnus par des récepteurs de la paroi vasculaire, tels que

- polypeptide vasodilatateur intestinal (VIP)
HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLN-SILN-NH₂
- polypeptide atrial natriurétique (ANP)

SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY

- lipocortine

HDMNKVLDL

- bradykinine

RPPGFSPFR;

b) peptides ligands des intégrines, tels que les peptides contenant la séquence RGD, ligand de la fibronectine;

c) facteurs chimiotactiques, tels que les formyl peptides et leurs antagonistes: FMLP, (N-formyl-Met-Leu-Phé);

d) hormones peptidiques tels que

l' α -MSH: Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH₂ et leurs antagonistes,

C) Métabolites naturels tels que:

- la biotine,

- la carnitine.

- le tétrahydrofolate et l'acide folique pouvant être à la fois un signal de reconnaissance vis-à-vis de certaines cellules possédant les récepteurs appropriés et un déstabilisateur des membranes cellulaires.

10. Complexe selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'acide nucléique peut être choisi parmi:

a) des gènes marqueurs, tels que

- gènes contenant la luciférase,

- protéine verte de la méduse *Aequorea victoria*,

- gènes contenant la β -galactosidase,

- gènes contenant la chloramphénicol acétyl transférase,

- gènes conférant la résistance à un antibiotique, tels que l'hygromycine, la néomycine etc...;

b) des gènes à visée thérapeutique, tels que

- récepteurs des lipoprotéines de faible densité, déficient dans les cas d'hypercholestérolémie,

- facteurs de coagulation: facteurs VIII et IX,

- phénylalanine-hydroxylase (phénylcétonurie),

- adénosine désaminase (immunodéficiencia ADA),

- enzymes lysosomiques, telles que la β -glucosidase dans le cas de la maladie de Gaucher,

- dystrophine et minidistrophine (myopathie),

- tyrosine hydroxylase (Parkinson),

- facteurs de croissance des neurones (Alzheimer),

- CFTR cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator (mucoviscidose),

- alpha1-antitrypsine,

- cytokines (interleukines, TNF facteur de nécrose des tumeurs),

- thymidine kinase du virus Herpes simplex,

- protéines du MHC, système majeur d'histocompatibilité, en particulier les HLA-B7,

- cytosine désaminase,

- gènes codant pour des ARN sens et antisens,

- gènes codant pour des ribozymes,

c) des gènes à visée vaccinale

- gènes codant pour des antigènes viraux (vaccination), par exemple: gène codant pour la nucléoprotéine du virus de la grippe.

11. Complexe selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel:

- le polymère, notamment la polylysine présente un degré de polymérisation d'environ 15 à environ 900, de préférence 200,

- les fonctions NH_3^+ libres des motifs lysine étant substituées dans un rapport de 35% par des résidus histidyle et éventuellement par une molécule constituant un signal de reconnaissance pour 1 à 50 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité d'au moins 10^5 l mole^{-1} vis-à-vis du récepteur de la cellule que le complexe doit cibler ou éventuellement par 20 à 100 molécules de signal de reconnaissance pour 200 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité inférieure à 10^5 l mole^{-1} vis à vis du susdit récepteur,

- l'acide nucléique présente une masse moléculaire d'environ 10^6 à environ 10^8 , et notamment de $3 \cdot 10^6$ à $30 \cdot 10^6$,

- le rapport entre le nombre moyen de paires de base de l'acide nucléique par molécule de motif de monomère, notamment la lysine est d'environ 0,2 à environ 6, de préférence d'environ 0,4 à environ 0,6.

12. Conjugué polymérique chargé positivement, contenant des motifs portant des fonctions NH_3^+ libres, et étant tel que :

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement d'environ 15% à environ 45%, notamment de 35%, ce rapport étant déterminé par exemple par résonance magnétique nucléaire, par des résidus entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, notamment la membrane des vésicules

d'endocytose,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

. ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

5 . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

. ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

10 - les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes :

. ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

15 . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

. les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés pouvant être substitués par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

20 - des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

. soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ des lysines),

25 . soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoylé), et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés, entraînant une diminution de charge,

30 . soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),

. soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

35 sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

13. Conjugué polymérique selon la revendication 9, et tel que défini selon

l'une des revendications 2 ou 3, ou contenant un groupement polymérique de formule selon l'une des revendications 4 ou 5.

5 14. Utilisation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 8, ou d'un conjugué selon l'une des revendications 9 ou 10, pour la transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* de cellules à l'aide d'un gène, notamment ceux définis à la revendication 6.

10 15. Utilisation d'un complexe ou d'un conjugué selon la revendication 11, caractérisé en ce que les cellules sont choisies parmi:

- des cellules souches hématopoïétiques;
- des cellules dendritiques,
- cellules du foie;
- cellules des muscles squelettiques;
- 15 - cellules de la peau:
 - . fibroblastes,
 - . kératinocytes,
 - . cellules dendritiques,
 - . mélanocytes.
- 20 - cellules des parois vasculaires;
 - . endothéliales;
 - . musculaires lisses;
- cellules épithéliales des voies aériennes;
- cellules du système nerveux central;
- 25 - cellules cancéreuses;
- cellules du système immunitaire, telles que des lymphocytes, des macrophages, des cellules NK etc...

30 16. Méthode de transfection *in vitro* ou *ex vivo*, caractérisée en ce que l'on met en présence un complexe, selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans un milieu contenant des cellules à transfecter, dans des conditions telles qu'il y a:

- passage du complexe à partir du milieu dans le cytoplasme des cellules,
- 35 - relargage de l'acide nucléique impliqué dans le susdit complexe dans le cytosol et/ou le noyau des cellules,
- transcription et expression de l'acide nucléique dans les cellules transfectées

- expression de la protéine correspondant au gène transfecté.

17. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de substance active, l'un au moins des complexes selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, ou l'un au moins des conjugués selon l'une des revendications 9 ou 10, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

18. Utilisation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 8, ou d'un conjugué selon l'une des revendications 9 ou 10, pour la préparation d'un médicament destiné par exemple au traitement de déficience métabolique congénitale ou acquise, ou au traitement de tumeurs, ou pour la préparation d'un vaccin, par exemple vaccin contre la grippe.

19. Trousse ou kit comprenant:

- un conjugué polymérique selon l'une des revendications 9 ou 10, tel que la polylysine, substituée par un résidu entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, ce conjugué polymérique étant apte à comporter éventuellement un signal de reconnaissance, lequel est préalablement fixé ou non sur le susdit conjugué polymérique, ledit signal de reconnaissance étant fonction de la cellule à cibler,

- éventuellement un plasmide contenant au moins un gène à transférer, et éventuellement le système de régulation de l'expression du susdit gène,

- des réactifs permettant la fixation éventuelle du signal de reconnaissance sur le susdit conjugué polymérique,

- des réactifs permettant la formation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 8, ou entre le conjugué polymérique et le gène à transférer, ou entre le conjugué polymérique et un plasmide contenant le gène à transférer,

- des réactifs permettant la transfection de la cellule par le susdit complexe.

d'endocytose,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :

. ils comportent un groupe fonctionnel leur permettant d'être fixés au susdit polymère,

5 . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

. ils peuvent comporter au moins une fonction NH_3^+ libre,

10 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères pouvant être également substituées par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus non chargés possédant en outre les propriétés suivantes :

. ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

15 . ils ne sont pas actifs en tant que signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

. les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés pouvant être substitués par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

20 - des molécules constituant un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire étant éventuellement présents :

. soit par substitution de certaines des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs monomères (par exemple $\epsilon\text{-NH}_3^+$ des lysines),

25 . soit sur certains des susdits résidus non chargés entraînant une diminution de charge (par exemple gluconoyl), et notamment sur les groupes hydroxyles des susdits résidus non chargés, entraînant une diminution de charge,

30 . soit sur certains des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple imidazole acétyl),

. soit par substitution de la fonction NH_3^+ éventuelle, libre des susdits résidus entraînant une déstabilisation des membranes cellulaires (par exemple histidine),

35 sous réserve que l'ensemble des fonctions NH_3^+ libres soit d'au moins 30% du nombre des motifs monomères du squelette polymérique du susdit conjugué polymérique.

13. Conjugué polymérique selon la revendication 12, et tel que défini

selon l'une des revendications 2 ou 3, ou contenant un groupement polymérique de formule selon l'une des revendications 4 ou 5.

5 14. Utilisation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 11, ou d'un conjugué selon l'une des revendications 12 ou 13, pour la transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* de cellules à l'aide d'un gène, notamment ceux définis à la revendication 6.

10 15. Utilisation d'un complexe ou d'un conjugué selon la revendication 11, caractérisé en ce que les cellules sont choisies parmi:

- des cellules souches hématopoïétiques;
- des cellules dendritiques,
- cellules du foie;
- cellules des muscles squelettiques;
- 15 - cellules de la peau:
 - . fibroblastes,
 - . kératinocytes,
 - . cellules dendritiques,
 - . mélanocytes.
- 20 - cellules des parois vasculaires:
 - . endothéliales;
 - . musculaires lisses;
- cellules épithéliales des voies aériennes;
- cellules du système nerveux central;
- 25 - cellules cancéreuses;
- cellules du système immunitaire, telles que des lymphocytes, des macrophages, des cellules NK etc...

30 16. Méthode de transfection *in vitro* ou *ex vivo*, caractérisée en ce que l'on met en présence un complexe, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans un milieu contenant des cellules à transfecter, dans des conditions telles qu'il y a:

- passage du complexe à partir du milieu dans le cytoplasme des cellules,
- 35 - relargage de l'acide nucléique impliqué dans le susdit complexe dans le cytosol et/ou le noyau des cellules,
- transcription et expression de l'acide nucléique dans les cellules transfectées

- expression de la protéine correspondant au gène transfecté.

5 17. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de substance active, l'un au moins des complexes selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, ou l'un au moins des conjugués selon l'une des revendications 12 ou 13, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10 18. Utilisation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 11, ou d'un conjugué selon l'une des revendications 12 ou 13, pour la préparation d'un médicament destiné par exemple au traitement de déficience métabolique congénitale ou acquise, ou au traitement de tumeurs, ou pour la préparation d'un vaccin, par exemple vaccin contre la grippe.

15 19. Trousse ou kit comprenant:

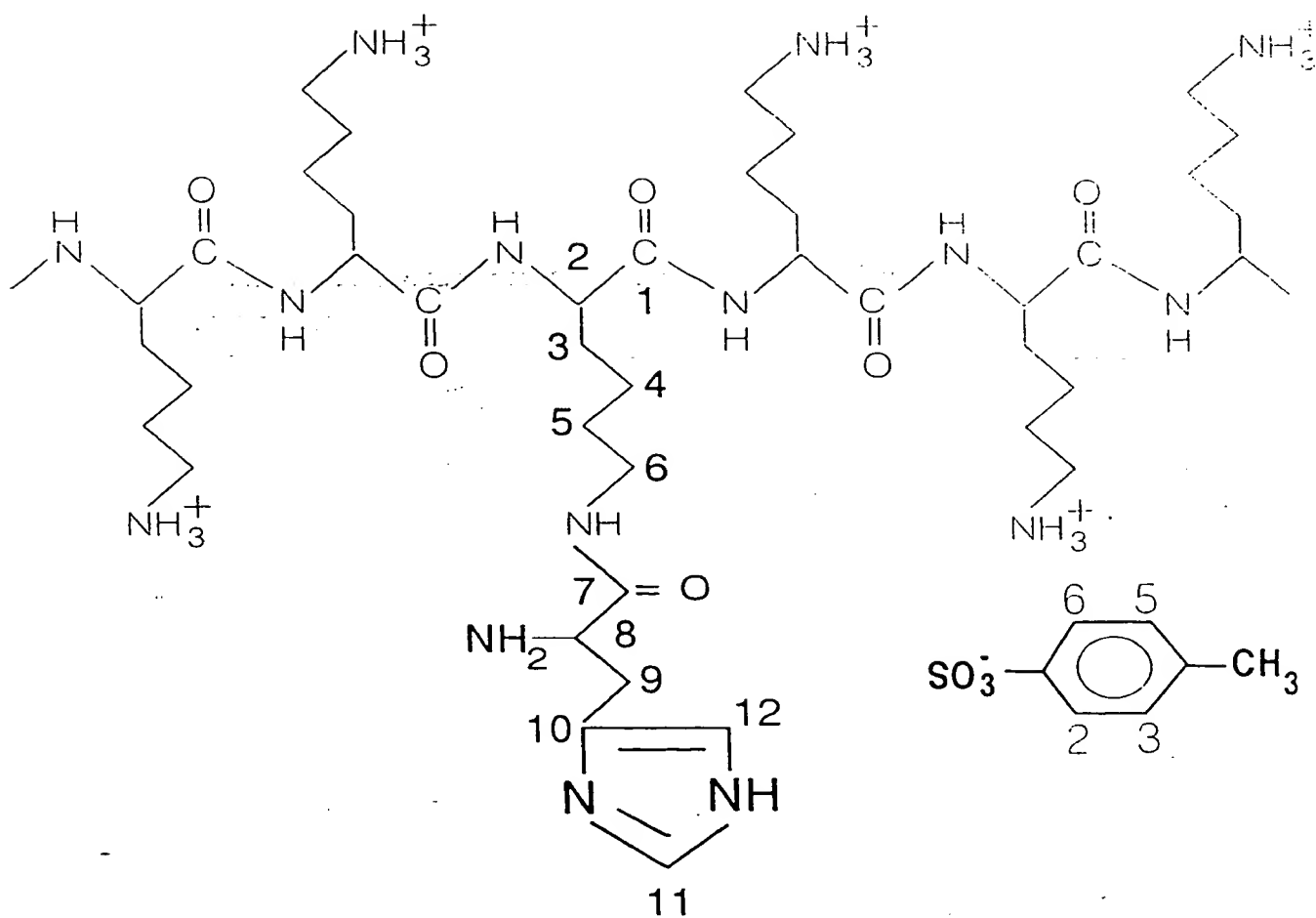
20 - un conjugué polymérique selon l'une des revendications 12 ou 13, tel que la polylysine, substituée par un résidu entraînant en milieu faiblement acide une déstabilisation des membranes cellulaires, ce conjugué polymérique étant apte à comporter éventuellement un signal de reconnaissance, lequel est préalablement fixé ou non sur le susdit conjugué polymérique, ledit signal de reconnaissance étant fonction de la cellule à cibler,

- éventuellement un plasmide contenant au moins un gène à transférer, et éventuellement le système de régulation de l'expression du susdit gène,

25 - des réactifs permettant la fixation éventuelle du signal de reconnaissance sur le susdit conjugué polymérique,

- des réactifs permettant la formation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 11, ou entre le conjugué polymérique et le gène à transférer, ou entre le conjugué polymérique et un plasmide contenant le gène à transférer,

30 - des réactifs permettant la transfection de la cellule par le susdit complexe.



HispLK

Figure 1

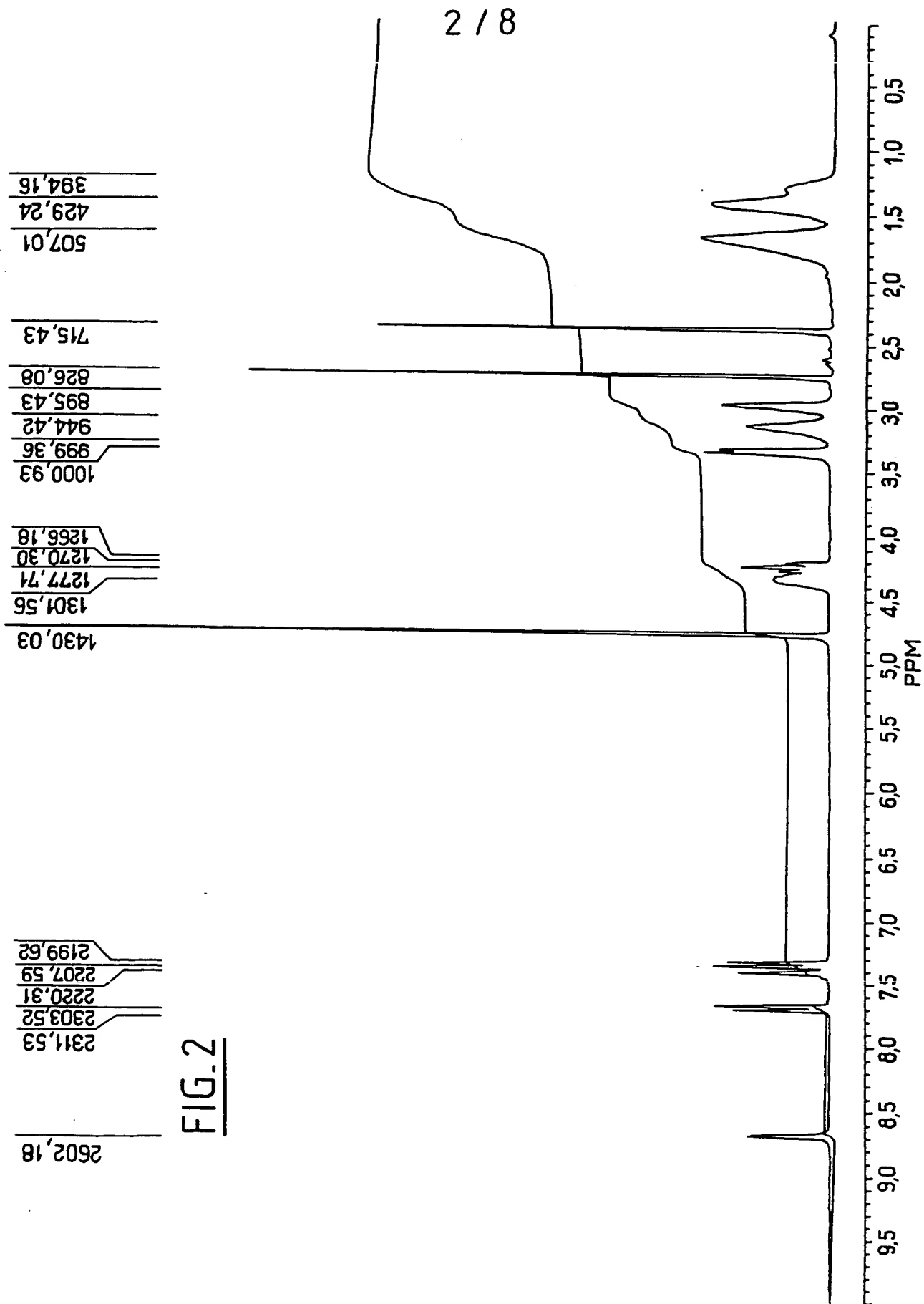
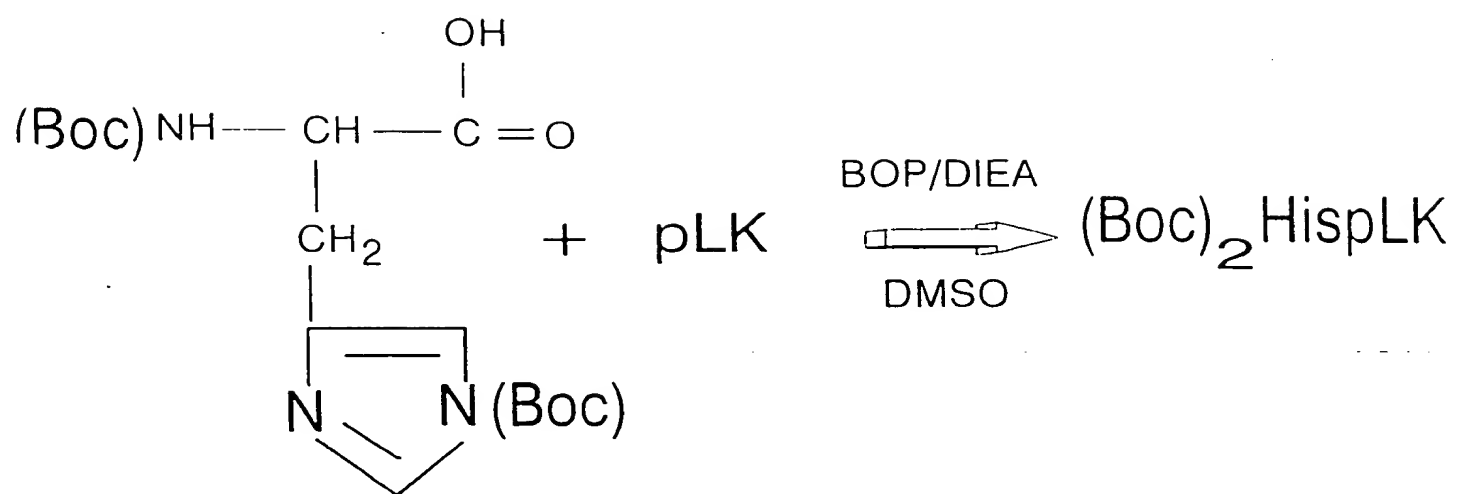


FIG. 2

I



II

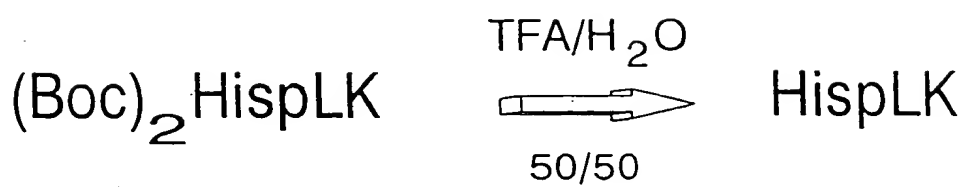


Figure 3

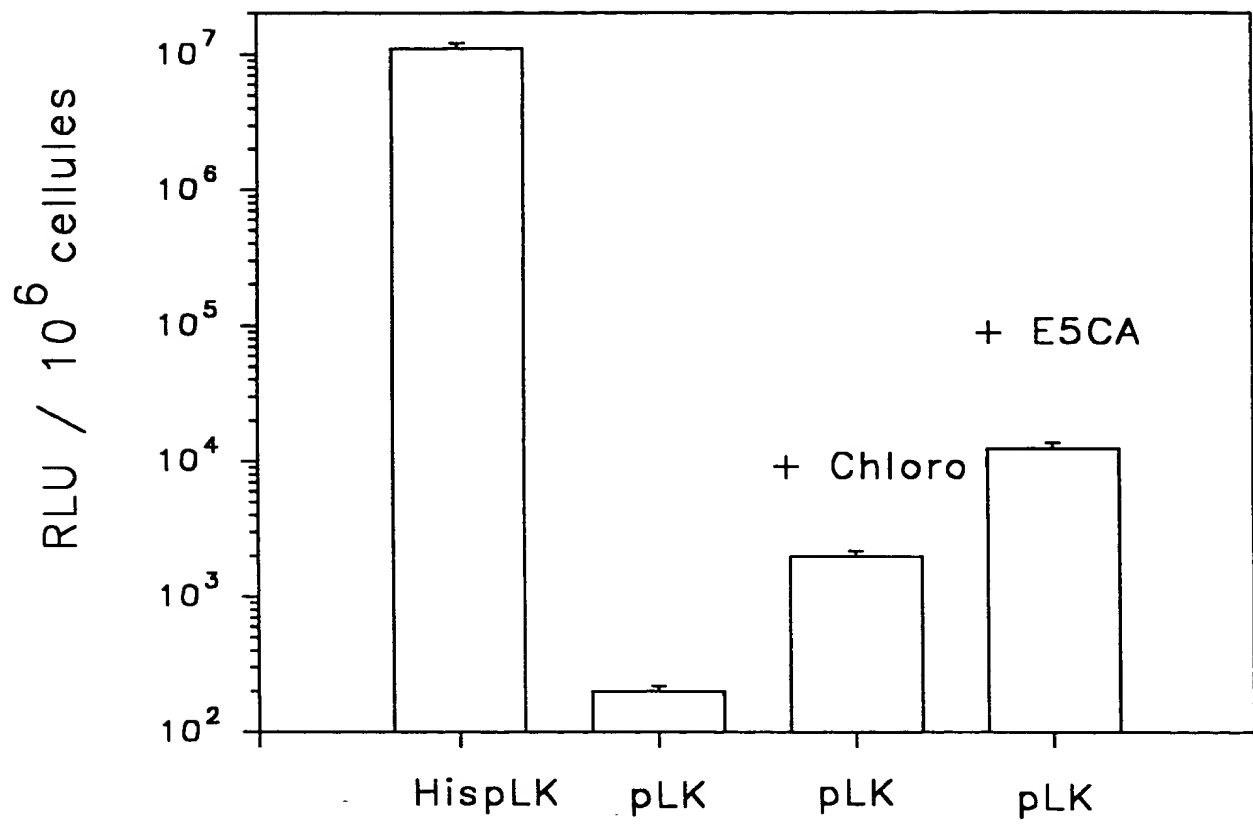


Figure 4

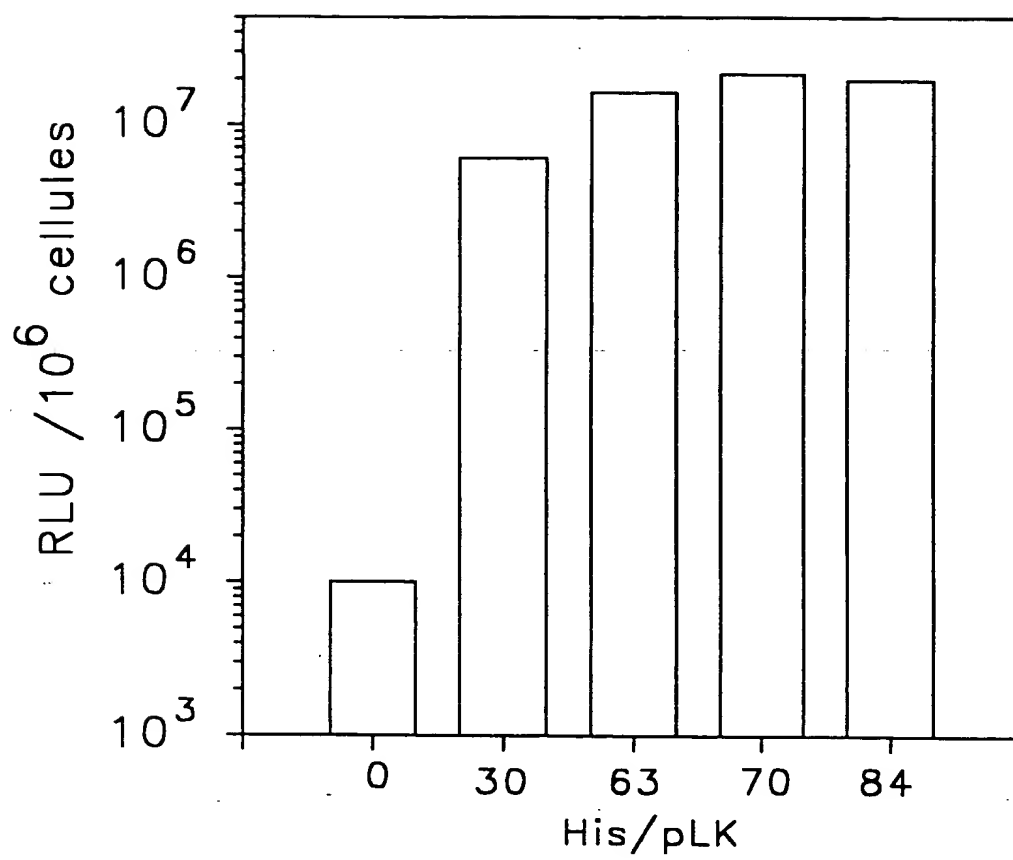


Figure 5

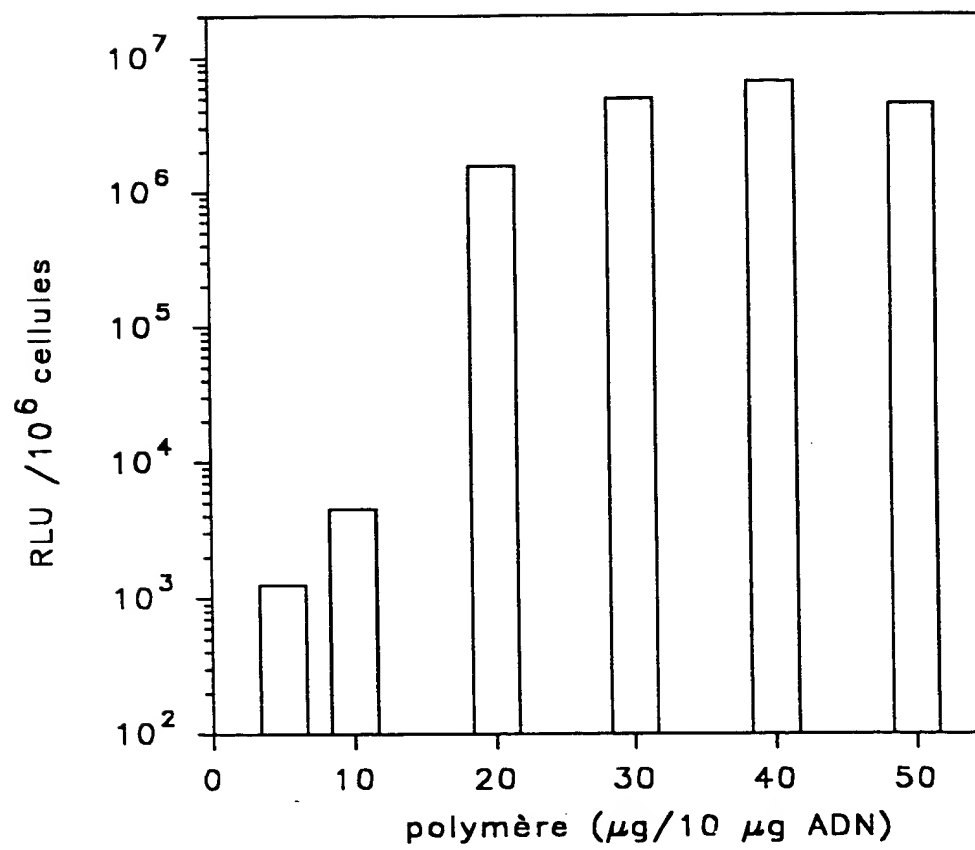


Figure 6

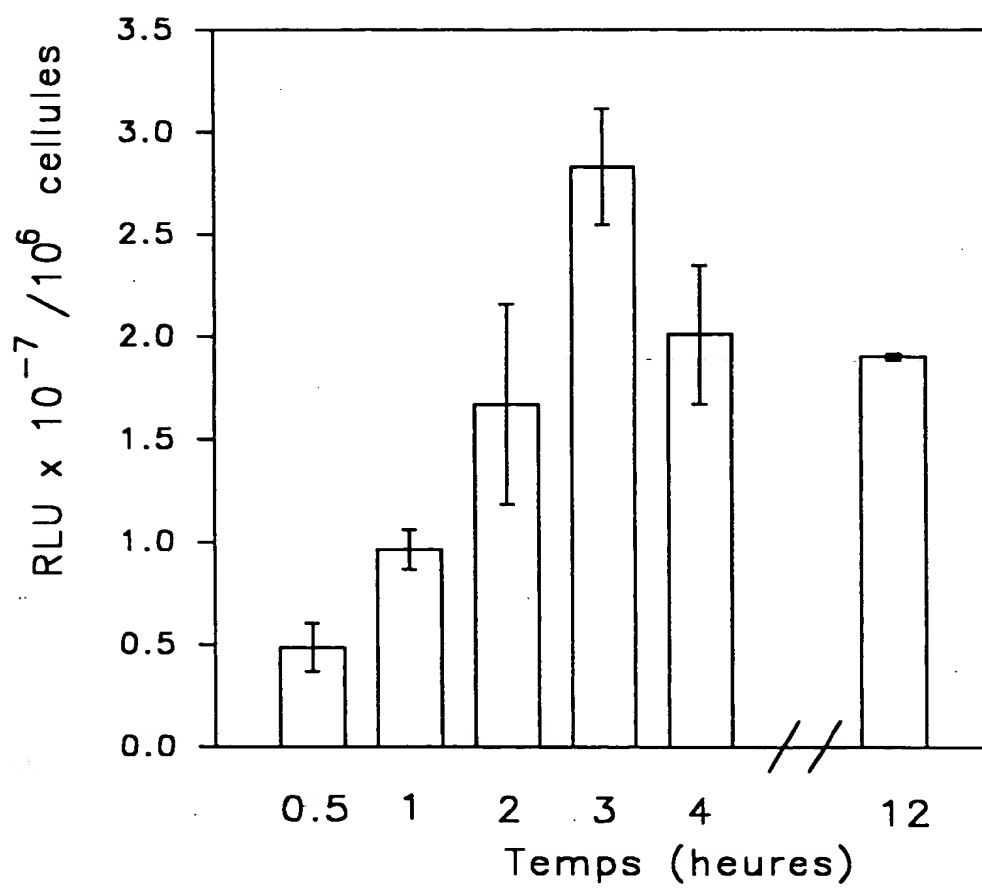


Figure 7

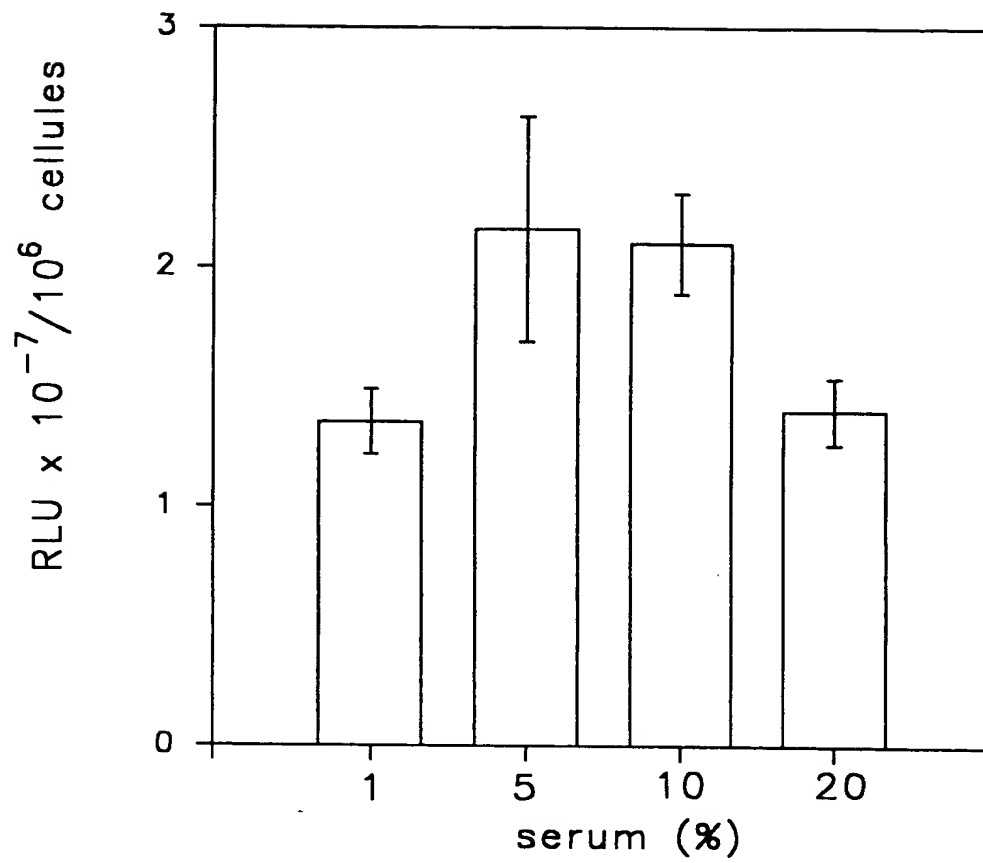


Figure 8